

**17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase 14 (17 $\beta$ -HSD14):  
Entwicklung und Synthese potenter und selektiver Inhibitoren  
zur strukturellen Charakterisierung und Untersuchung der  
physiologischen Rolle des Enzyms**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Florian Braun, M.Sc.**

aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn **2017**

Erstgutachter: **Prof. Dr. Gerhard Klebe**

Zweitgutachterin: **Dr. Sandrine Marchais-Oberwinkler**

Eingereicht am **25.08.2017**

Tag der mündlichen Prüfung am **06.10.2017**

Hochschulkennziffer: 1180

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit vom April 2014 bis Juni 2017 durchgeführt.



## Veröffentlichungen

Die folgenden wissenschaftlichen Beiträge, geordnet nach Art und Datum der Veröffentlichung, sind aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangen.

### Publikationen

Bertoletti, N.\*; **Braun, F.\***; Lepage, M.; Möller, G.; Adamski, J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. New Insights into Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14: First Crystal Structures in Complex with a Steroidal Ligand and with a Potent Nonsteroidal Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 6961–6967.

**Braun, F.\***; Bertoletti, N.\*; Möller, G.; Adamski, J.; Steinmetzer, T.; Salah, M.; Abdelsamie, A. S.; van Koppen, C. J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. First Structure–Activity Relationship of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14 Nonsteroidal Inhibitors and Crystal Structures in Complex with the Enzyme. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 10719–10737.

\* geteilte Erstautorenschaft

### Posterbeiträge auf Konferenzen

**F. Braun**, N. Bertoletti, C. van Koppen, M. Salah, G. Möller, J. Adamski, A. Heine, G. Klebe, S. Marchais-Oberwinkler, “17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14: Scaffold identification of the first inhibitors, structure optimization and 3D-characterization in complex with the protein”, XXIV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, EFMC-ISMC 2016, Manchester, 29.08-01.09.2016.

**F. Braun**, N. Bertoletti, N. Guragossian, M. le Borgne, L. Ettouati, G. Möller, J. Adamski, A. Heine, G. Klebe, S. Marchais-Oberwinkler, “17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14: Inhibitor Optimization using a Structure-Based Approach”, 21<sup>ème</sup> Journée Scientifique des L'EDISS, Lyon, 13.10.2016.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	VII
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	XI
<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSDs)	1
1.2 17 $\beta$ -HSDs	2
1.2.1 Funktion einiger 17 $\beta$ -HSDs	3
1.2.2 Präferenz der Katalyserichtung	4
1.2.3 Katalytischer Mechanismus von 17 $\beta$ -HSD1	6
1.3 17 $\beta$ -HSD14	7
1.3.1 Biochemische Charakterisierung der S205- und T205-Varianten	7
1.3.2 Kristallstruktur von 17 $\beta$ -HSD14	8
1.3.3 Dockingstudien an 17 $\beta$ -HSD14	9
1.4 Referenzen	11
<b>2 Motivation und Aufgabenstellung</b>	17
<b>3 Identifikation der ersten nichtsteroidalen 17<math>\beta</math>-HSD14 Inhibitoren</b>	19
3.1 Zusammenfassung	20
3.2 Design von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren	21
3.3 Synthese	26
3.4 Biologische Ergebnisse	32
3.4.1 Fluoreszenzbasierter Assay zur Bestimmung der 17 $\beta$ -HSD14 Inhibition	32
3.4.2 17 $\beta$ -HSD14 Inhibition	32
3.5 Bestimmung physikochemischer Parameter	39
3.6 Beschreibung der Kristallstrukturen	40
3.7 Selektivität	50
3.8 Diskussion der Ergebnisse	52
3.8.1 Vergleich der Apo- und Holostruktur und Strukturen der Inhibitoren als ternärer Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14	52
3.8.2 Struktur-Wirkungsbeziehung der vorgestellten Inhibitoren	52
3.8.3 Zweite Bindetasche von Verbindung 3.8	55
3.8.4 Vergleich der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD1, 17 $\beta$ -HSD2 und 17 $\beta$ -HSD14	56
3.8.5 Basis für ein weiteres strukturbasiertes Wirkstoffdesign	56
3.9 Fazit	57

3.10	Experimental Section.....	58
3.10.1	Chemistry.....	58
3.10.2	Biological Methods.....	95
3.11	Appendix.....	97
3.12	Referenzen.....	100
<b>4</b>	<b>Benzothiazolketone und –amide als Leitstrukturen zur Entwicklung von 17<math>\beta</math>-HSD14 Inhibitoren.....</b>	<b>105</b>
4.1	Einleitung.....	105
4.2	Design von Benzothiazolketonen.....	106
4.3	Synthese.....	109
4.4	Löslichkeit und biologische Ergebnisse.....	110
4.4.1	Löslichkeit.....	110
4.4.2	17 $\beta$ -HSD14 Inhibition.....	110
4.5	Diskussion der Ergebnisse.....	114
4.5.1	Thiazolketone.....	114
4.5.2	Benzothiazolketone.....	116
4.6	Fazit.....	118
4.7	Design von Benzothiazolamiden.....	119
4.8	Synthese.....	123
4.9	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14.....	127
4.9.1	Probleme während des fluoreszenzbasierten Assays.....	127
4.9.2	Beschreibung der Ergebnisse.....	130
4.10	Diskussion der Ergebnisse.....	133
4.10.1	Probleme während des fluoreszenzbasierten Assays.....	133
4.10.2	Inhibitorische Aktivitäten gegenüber 17 $\beta$ -HSD14.....	133
4.11	Fazit.....	137
4.12	Experimental Section.....	137
4.12.1	Chemistry.....	137
4.12.2	Inhibition of 17 $\beta$ -HSD14.....	160
4.12.3	MOE models of compounds <a href="#">4.8</a> , <a href="#">4.9</a> , <a href="#">4.12</a> , <a href="#">4.13</a> and <a href="#">4.16</a> .....	160
4.13	Referenzen.....	161
<b>5</b>	<b>Strukturbasiertes Design von 17<math>\beta</math>-HSD14 Inhibitoren.....</b>	<b>163</b>
5.1	Einleitung.....	164
5.2	Strukturbasiertes Design.....	165
5.3	Synthese.....	167



5.4	Bestimmung physikochemischer Parameter.....	175
5.5	Biologische Ergebnisse.....	173
5.5.1	<i>17<math>\beta</math>-HSD14 Inhibition</i> .....	173
5.6	Bestimmung der Kristallstrukturen.....	176
5.6.1	<i>Beschreibung der Bindungsmodi der pyridinbasierenden Inhibitoren im Komplex mit 17<math>\beta</math>-HSD14</i> .....	176
5.6.2	<i>Beschreibung der Bindungsmodi von vier chinolinbasierenden Inhibitoren im Komplex mit 17<math>\beta</math>-HSD14</i> .....	178
5.7	Vergleich der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 und 17 $\beta$ -HSD10.....	181
5.8	Untersuchung der Selektivität ausgewählter Verbindungen.....	183
5.9	Bestimmung weiterer biologischer Eigenschaften.....	185
5.9.1	<i>Zytotoxizität</i> .....	185
5.9.2	<i>P-gp ATPase Aktivitätsassay</i> .....	185
5.10	Diskussion der Ergebnisse.....	189
5.10.1	<i>Struktur-Wirkungsbeziehung der im ersten Ansatz entworfenen pyridinbasierenden Inhibitoren</i> .....	187
5.10.2	<i>Selektivität der pyridinbasierenden Inhibitoren</i> .....	187
5.10.3	<i>Struktur-Wirkungsbeziehung der im zweiten Ansatz entworfenen Verbindungen</i> .....	188
5.10.4	<i>Entdeckung eines alternativen Bindungsmodus für Verbindung <a href="#">5.10</a></i> .....	190
5.10.5	<i>Selektivität der chinolinbasierenden Inhibitoren</i> .....	191
5.10.6	<i>Identifizierung möglicher tool compounds</i> .....	191
5.11	Fazit.....	193
5.12	Experimental Section.....	195
5.12.1	<i>Chemistry</i> .....	195
5.12.2	<i>Biological methods</i> .....	219
5.13	Appendix.....	220
5.13.1	<i>Physicochemical properties</i> .....	220
5.13.2	<i>MOE models</i> .....	221
5.13.3	<i>Crystallographic tables</i> .....	223
5.14	Referenzen.....	225
<b>6</b>	<b>Fragmentbasierter Entwurf von 17<math>\beta</math>-HSD14 Inhibitoren</b> .....	<b>229</b>
6.1	Einleitung .....	229
6.2	Design.....	231
6.3	Synthese.....	235
6.4	Löslichkeit und biologische Ergebnisse.....	239
6.4.1	<i>Löslichkeit</i> .....	239
6.4.2	<i>17<math>\beta</math>-HSD14 Inhibition</i> .....	239

6.5	Kristallstrukturanalyse.....	242
6.5.1	<i>Beschreibung der Kristallstrukturen</i> .....	242
6.6	Diskussion der Ergebnisse.....	244
6.7	Fazit.....	246
6.8	Experimental Section.....	247
6.8.1	<i>Chemistry</i> .....	247
6.8.2	<i>Biological methods</i> .....	255
6.9	Referenzen.....	256
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>257</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>271</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>273</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>275</b>

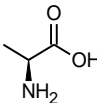
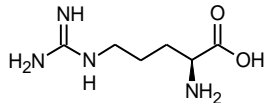
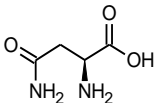
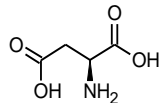
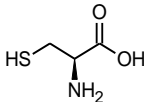
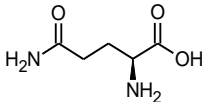
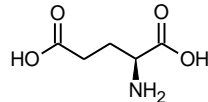
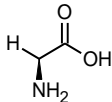
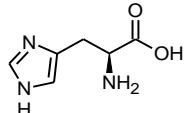
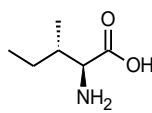
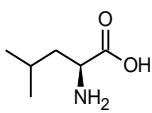
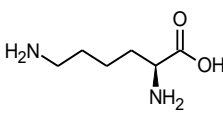
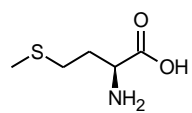
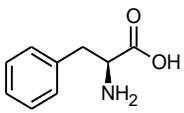
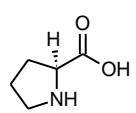
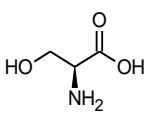
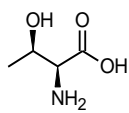
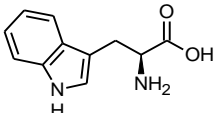
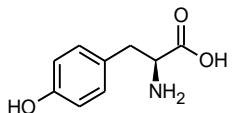
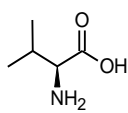
## Abkürzungsverzeichnis

5-diol	5-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol
Å	Ångström (1 Å = 10 <sup>-10</sup> m)
A $\beta$	Amyloid $\beta$ -Protein
Abb.	Abbildung
abs.	absolutiert
ATP	Adenosintriphosphat
Ar	Aryl, aromatisch
ADME	engl. <i>absortion, distribution, metabolism, excretion</i>
BBB	Blut-Hirn-Schranke (engl. <i>Blood-brain-barrier</i> )
ber.	berechnet
Boc, boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
Bn	Benzyl
°C	Grad Celsius
<i>c</i>	berechnet (engl. <i>calculated</i> )
CDCl <sub>3</sub>	Chloroform (deutertiert)
<i>c</i> -Pr	cyclopropyl
$\delta$	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett (NMR); tage
D	rechts (lat. <i>dexter</i> )
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimethylsulfoxid (deutertiert)
E1	Estron
E2	Estradiol
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid-Hydrochlorid
eq	Äquivalente
ER	Estrogenrezeptor
<i>et al.</i>	und Andere (lat. <i>Et alii, et aliae</i> )
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
<i>F</i> <sub>c</sub>	berechnete Strukturfaktor Amplituden
<i>F</i> <sub>o</sub>	beobachtete Strukturfaktor Amplituden
g	Gramm
gef.	gefunden
[ <sup>3</sup> H]	tritiummarkiert
<i>h</i>	humanes
h	Stunde(n)
H-Brücke/H-bond	Wasserstoffbrücke

HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IG <sub>50</sub>	Konzentration bei der 50% einer Population überleben
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
<i>i</i> -Pr	isopropyl
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	Spin-Spin-Kopplung (NMR)
kat., cat.	katalytisch
<i>k</i> <sub>cat</sub>	molekulare Aktivität
<i>K</i> <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
<i>K</i> <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
L	links (lat. <i>Laevus</i> )
L	Liter
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LHMDS	Lithiumhexamethyldisilazan
log <i>P</i>	Verteilungskoeffizient <i>n</i> -Octanol/Wasser
μ	mikro
μW	Mikrowellenbestrahlung
<i>m</i>	<i>meta</i>
m	Multiplet (NMR); milli
M	Molar
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mp	Schmelzpunkt
MS	Massenspektrometrie
MW	molekulare Masse
BuLi	Butyllithium
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>Nuclear magnetic resonance</i> )
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
Pd/C	Palladium auf Kohle
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P-gp	P-Glykoprotein
p <i>K</i> <sub>a</sub>	Säurekonstante (negative dekadische Logarithmus)
ppm	<i>parts per million</i>
quant.	quantitativ
RBA	relative Bindungsaffinität
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RMSD	engl. <i>root-mean-square deviation</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulet (NMR)

SDR	engl. <i>short-chain dehydrogenase/reductase</i>
T	Testosteron
t	Triplet (NMR)
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLC, DC	Dünnschichtchromatographie
tPSA	engl. <i>total polar surface area</i>
$V_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Verb.	Verbindung
W	Watt

Übersicht der proteinogenen  $\alpha$ -Aminosäuren mit Ein- und Dreibuchstabencode.

			
Alanin	Arginin	Asparagin	Asparaginsäure
Ala, A	Arg, R	Asn, N	Asp, D
			
Cystein	Glutamin	Glutaminsäure	Glycin
Cys, C	Gln, Q	Glu, E	Gly, G
			
Histidin	Isoleucin	Leucin	Lysin
His, H	Ile, I	Leu, L	Lys, K
			
Methionin	Phenylalanin	Prolin	Serin
Met, M	Phe, F	Pro, P	Ser, S
			
Threonin	Tryptophan	Tyrosin	Valin
Thr, T	Trp, W	Tyr, Y	Val, V



# Einleitung

# 1

## 1.1 Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSDs)

Hydroxysteroid Dehydrogenasen (HSDs) gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen, die NAD(P)-abhängig die Umsetzung von sekundären Alkoholen zu ihren korrespondierenden Ketonen und *vice versa* katalysieren. Entsprechend ihrem Namen finden diese Oxidationen bzw. Reduktionen regio- und stereoselektiv an unterschiedlichen Positionen (3 $\alpha$ -, 3 $\beta$ -, 11 $\beta$ -, 17 $\beta$ -, 20 $\alpha$ -, 20 $\beta$ -Position) ihrer steroidalen Substrate statt. Die an der Umsetzung von Steroiden beteiligten HSDs spielen eine entscheidende Rolle in der Biosynthese, sowie in der Aktivierung und Inaktivierung von Steroidhormonen. Weiterhin sind Vertreter dieser Enzymklasse an den Transformationen von verschiedenen nichtsteroidalen Verbindungen involviert.<sup>1-4</sup>

Hormone werden in endokrinen Drüsen bereitgestellt und danach ins Blut abgegeben. Nach dem Transport über das Kreislaufsystem gelangen sie zu ihren Zielorten, wo sie einen rezeptorvermittelten Mechanismus ausüben. Dieses klassische Bild der Wirkentfaltung wird als Endokrinologie bezeichnet.<sup>4</sup> Demgegenüber wurde von LABRIE *et al.*<sup>5</sup> der Begriff der Intrakrinologie eingeführt. Demnach üben lokal produzierte Androgene und/oder Estrogene ihre Funktion in denjenigen Zellen aus, in denen sie produziert wurden, ohne zuvor in den extrazellulären Raum ausgeschieden worden zu sein.<sup>6</sup> HSDs sind Teil dieses intrakrinen Systems, in dem sie in den entsprechenden Zielgeweben die Steroidhormone aktivieren bzw. inaktivieren und auf diese Weise intrazellulär die Transaktivierung von Steroidhormonrezeptoren regulieren.<sup>7,8</sup> Durch die Fähigkeit die lokalen Konzentrationen von aktiven und inaktiven Hormonderivaten regulieren zu können, sind HSDs als molekulare Schalter zu betrachten, die als Prärezeptorregulatoren auf die Funktion von Steroidhormonen wirken, bevor sie an die entsprechenden Rezeptoren angreifen.<sup>9,10</sup>

Unter Berücksichtigung des Konzepts des molekularen Schalters schienen vielversprechende therapeutischen Ansätze realisierbar wie die Blockade von spezifischen steroidogenen Enzymen mittels potenter und selektiver Inhibitoren zur Behandlung von steroidhormonabhängigen Erkrankungen. Diese Vorgehensweise konnte bereits für nicht-HSD Enzyme realisiert werden, die ebenfalls die lokalen Konzentrationen von Steroidhormonen beeinflussen. Die Inhibition der Aromatase<sup>11-13</sup> (bei postmenopausalen Frauen) und der 5 $\alpha$ -Reduktase<sup>14-16</sup> kann als Beispiel aufgeführt werden, die Schlüsselenzyme der Androgen- und Estrogenbiosynthese darstellen.<sup>4</sup>

## 1.2 17 $\beta$ -HSDs

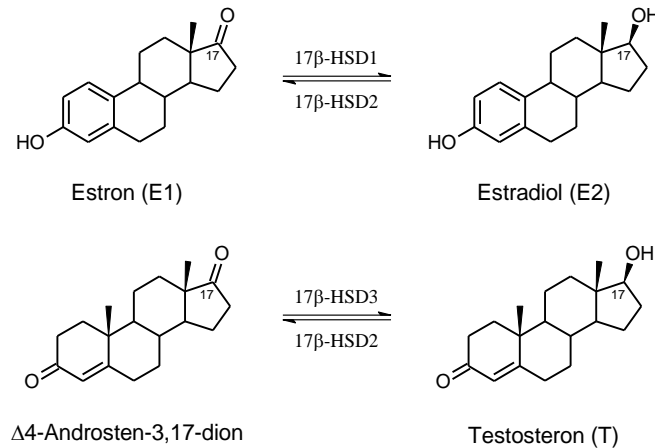
Im Jahr 1958 wurde von LANGER und ENGEL zum ersten Mal ein Enzym beschrieben, das die Umsetzung in Position 17 von Steroidhormonen wie Androgenen und Estrogenen katalysiert.<sup>17</sup> Seit dem konnten mindestens vierzehn verschiedene 17 $\beta$ -HSD Subtypen identifiziert werden, die entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert wurden. Zwölf 17 $\beta$ -HSDs konnten im menschlichen Körper nachgewiesen werden, wohingegen 17 $\beta$ -HSD6 und 9 lediglich bei Nagetieren gefunden wurden.<sup>4,18,19</sup> LUU-THE *et al.* berichteten ebenfalls von einem 17 $\beta$ -HSD Subtypen dem sie vorläufig den Namen 17 $\beta$ -HSD15 zuteilten.<sup>20</sup> Bis auf die Aldo/Ketoreduktase (AKR) 17 $\beta$ -HSD5 zählen alle 17 $\beta$ -HSDs zur Superfamilie der SDRs (*short-chain dehydrogenases/reductases*).<sup>21</sup> Untereinander verglichen besitzen diese Vertreter zwar eine geringe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz (25-30%), aber sie weisen alle Charakteristika der SDR-Familie auf wie die ROSSMANN-Faltung, die an der Bindung des Cofaktors NAD(P) beteiligt ist. Außerdem teilen sie eine konservierte katalytische Triade bestehend aus Ser142, Tyr155 und Lys159 (Nummerierung für 17 $\beta$ -HSD1), die für die Umsetzung der jeweiligen Substrate essentiell ist. Dabei findet bei allen Vertretern dieser Enzymfamilie ein Hydridtransfer vom Cofaktor auf die Ketogruppe des Substrats statt, oder umgekehrt vom Hydroxysteroid auf den Cofaktor.<sup>19,22</sup> Da alle 17 $\beta$ -HSDs *in vitro* die Oxidation und/oder Reduktion von Steroidhormonen in Position 17 des Steroidgerüsts katalysieren, wurde ihnen die Bezeichnung 17 $\beta$ -HSD zugeteilt, obwohl sie *in vivo* eine breite Substratspezifität (u.a. Steroide, Fettsäuren, Gallensäuren und Retinsäure) aufweisen können. Weiterhin unterscheiden sich 17 $\beta$ -HSDs in ihrer Gewebeverteilung, der subzellulären Lokalisation und ebenfalls in ihrer katalytischen Präferenz.<sup>4,18,19</sup> Dementsprechend können sie in die *in vivo* oxidativen 17 $\beta$ -HSD Typen 2, 4, 6, 8, 10, 11 und 14, sowie in die *in vivo* reduktiven 17 $\beta$ -HSD Typen 1, 3, 5, 7, 12 und 15 unterteilt werden.

In den vergangenen Jahren erlangten 17 $\beta$ -HSDs großes Interesse als potentielle Targets zur Behandlung von sexualhormonabhängigen Krankheiten. Es konnten beispielsweise Inhibitoren der Subtypen 1, 2 und 3 entwickelt werden, mit denen nach *in vivo* Verabreichung ein „*proof of concept*“ für die Behandlung von Brustkrebs, Osteoporose und Prostatakrebs erbracht wurde, wie im folgenden Abschnitt näher beschrieben. Die gewebespezifische Expression dieser Enzymfamilie und die Tatsache, dass sie oft die letzte Stufe der Steroidbiosynthese katalysieren, stellen wichtige Vorteile dieser Gruppe von Enzymen dar. Weiterhin kann die Tatsache, dass die Strukturen von wichtigen 17 $\beta$ -HSDs aufgeklärt wurden, die rationale Entwicklung von selektiven Inhibitoren erleichtern.<sup>4</sup>



### 1.2.1 Funktion einiger 17 $\beta$ -HSDs

Lediglich für die Subtypen 1, 2 und 3 wurde beschrieben, dass sie hauptsächlich Steroide als Substrate akzeptieren (Abb. 1.1).<sup>19,22</sup>



**Abb. 1.1:** Umsetzung von Estrogenen und Androgenen durch verschiedene 17 $\beta$ -HSDs.

**17 $\beta$ -HSD1** wurde als erster Vertreter der 17 $\beta$ -HSD Familie entdeckt<sup>17</sup> und ist der am besten charakterisierte Subtyp. Das Enzym katalysiert primär die Reduktion von Estron (E1) zum hochaktiven Estradiol (E2) unter Verwendung von NADPH als Cofaktor. Bis heute sind rund 20 Kristallstrukturen des Enzyms in der *protein data bank* (PDB) bekannt, wobei keine Struktur mit dem Substrat E1 erhalten werden konnte. Das Enzym wird im Zytoplasma exprimiert und ist vor allem in den Ovarien und der Plazenta zu finden als auch im peripheren Gewebe der Brust und des Endometriums.<sup>23</sup> Ein erhöhtes Verhältnis von E2 zu E1 im Zusammenhang mit einem erhöhten Spiegel an 17 $\beta$ -HSD1 mRNA weisen u.a. auf eine Schlüsselfunktion des Enzyms in der Ausbildung von Brustkrebs, Ovarialtumoren und Endometriose hin.<sup>4</sup> Die gewebespezifische Expression des Enzyms macht es zu einem attraktiven Target für die Behandlung von weiblichen Erkrankungen wie es mit dem bereits angesprochenen „*proof of concept*“ für die Brustkrebsbehandlung verdeutlicht wurde.<sup>24–28</sup> Ebenso berichtet Forendo Pharma Ltd.<sup>©</sup> von der Entwicklung eines Kandidaten für die Therapie von Endometriose, der sich vor dem Eintritt in die klinische Studie befindet.<sup>29</sup>

**17 $\beta$ -HSD2** ist ein an das endoplasmatische Retikulum gebundenes Enzym, das hauptsächlich die hochaktiven 17 $\beta$ -Hydroxysteroiden wie E2 und Testosteron (T) in ihre weniger aktiven Ketoformen mit Hilfe des Cofaktors NAD<sup>+</sup> umwandelt.<sup>30</sup> Bislang konnten allerdings keine Kristallstrukturen von diesem Subtypen erhalten werden. 17 $\beta$ -HSD2 weist eine starke Verteilung in verschiedenen Gewebearten auf. Es konnte u.a. eine Expression in Plazenta, Leber, Dünndarm, Prostata, Nieren und in Osteoblasten beobachtet werden.<sup>31,32</sup> Das Sinken der E2- und T-Spiegel im fortgeschrittenen Alter ist eine weit verbreitete Ursache für die Entwicklung von Osteoporose. Durch die Expression von 17 $\beta$ -HSD2 in den Osteoblasten ist das Enzym ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung

dieser Erkrankung, indem durch die Inhibition von 17 $\beta$ -HSD2 der lokale Spiegel an E2 und T angehoben wird. Schließlich konnten BAGI *et al.* nach *in vivo* Tests an Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) feststellen, dass die Inhibition von 17 $\beta$ -HSD2 lokal zu erhöhten Estrogenspiegeln führten, was zu einer Erhaltung der Knochenbildung und zu einer Knochenstärkung führte.<sup>33</sup>

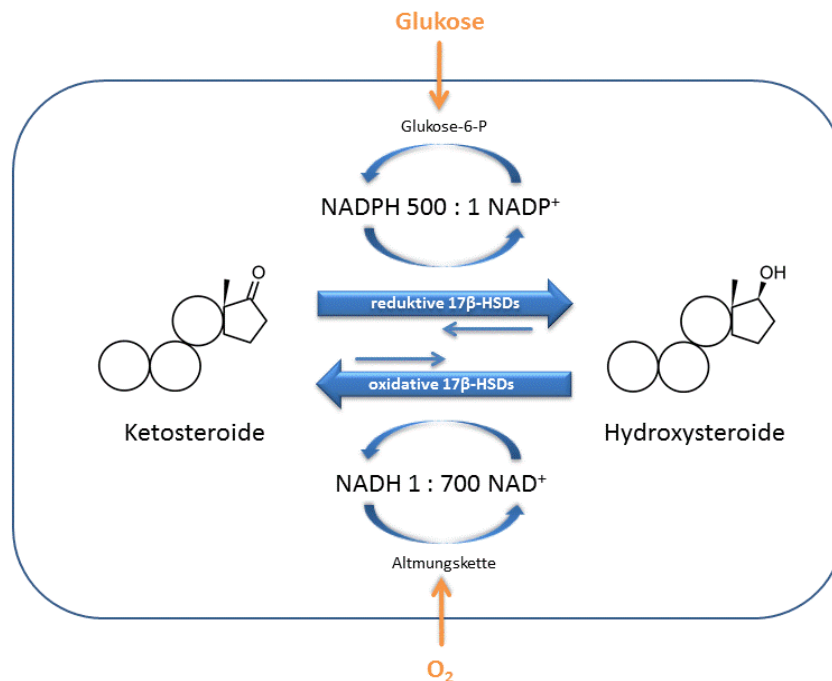
**17 $\beta$ -HSD3** ist das wichtigste Enzym zur Aktivierung von  $\Delta$ 4-Androsten-3,17-dion zu T und wird hauptsächlich in den Testikeln exprimiert.<sup>34</sup> Die mRNA des Enzyms wird im Prostatakrebsgewebe überexprimiert, wodurch Inhibitoren dieses Subtypen mögliche Therapeutika zur Behandlung von Prostatakrebs darstellen können wie durch DAY *et al.* mit Hilfe eines Xenotransplantationsexperiments im Rahmen eines „*proof of concepts*“ bewiesen werden konnte.<sup>35</sup>

Nach neueren Erkenntnissen konnte für die Subtypen 1 und 2 ebenfalls eine Funktion in der Umwandlung von Retinsäuren beobachtet werden, während für die restlichen Vertreter der 17 $\beta$ -HSD Familie eine weitaus ausgeprägtere Multifunktionalität bekannt ist:

**17 $\beta$ -HSD4** ist neben der Deaktivierung von E2 an der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und an der Gallensäureproduktion beteiligt. **17 $\beta$ -HSD5** und **17 $\beta$ -HSD7** besitzen eine duale Aktivität als Hydroxysteroid Dehydrogenasen und setzen Steroidhormone an den Positionen 3 und 17 um. Neben ihrer Rolle im Estrogenmetabolismus sind sie in der Prostaglandin- (Typ5) bzw. Cholesterolsynthese involviert, während **17 $\beta$ -HSD12** und **17 $\beta$ -HSD8** an der Fettsäureverlängerung beteiligt sind und **17 $\beta$ -HSD6** sowie **17 $\beta$ -HSD9** an der Umwandlung von Retinoiden wirken. **17 $\beta$ -HSD10** weist in dieser Enzymfamilie die breiteste Substratspezifität auf. Es ist u.a. am Fettsäure- und Gallensäuremetabolismus integriert und lässt Estrogene, Androgene, Progestine und Kortikoide als Substrate zu. Weiterhin bindet das Enzym an  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ), wodurch 17 $\beta$ -HSD10 eine entscheidende Rolle am Auftreten der Alzheimer-Erkrankung zugeschrieben wird.<sup>4,18,19,22,34</sup>

### 1.2.2 Präferenz der Katalyserichtung

17 $\beta$ -HSDs können *in vitro* sowohl die Oxidations- als auch die Reduktionsreaktion katalysieren. Hingegen besteht *in vivo* eine Präferenz für eine Katalyserichtung, die zum einen durch die Konzentration der Redoxformen der Cofaktoren in der Zelle beeinflusst wird. Dabei finden oxidative Reaktionen im Zytosol vorwiegend in Anwesenheit von NAD<sup>+</sup> statt (ca. 700-facher Überschuss im Vergleich zu NADH), das homöostatisch über die Atmungskette erneuert wird. Reduktionen verlaufen im Zytosol in Anwesenheit von NADPH (ca. 500-facher Überschuss im Vergleich zu NADP<sup>+</sup>), welches kontinuierlich über den Pentosephosphatweg regeneriert wird (**Abb. 1.2**).<sup>4,36</sup>



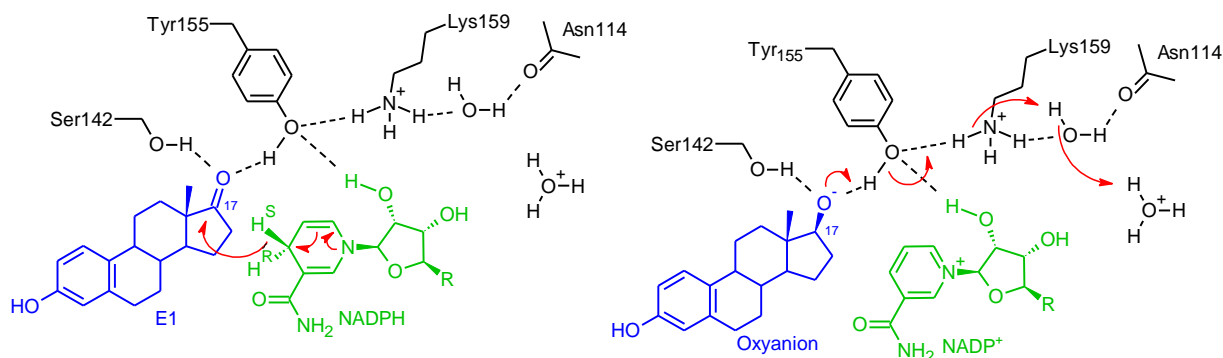
**Abb. 1.2:** Zusammenhang zwischen dem Metabolismus und der katalytischen Präferenz von 17β-HSDs. Abbildung modifiziert nach Sherbet *et al.*<sup>36</sup>

Zum Anderen bestehen unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Enzyme zu den entsprechenden phosphorylierten oder unphosphorylierten Cofaktoren.<sup>36</sup> Es konnte durch Röntgenstrukturanalysen nachgewiesen werden, dass die Phosphatgruppe des NADPHs eine Salzbrücke zu einem Argininrest der *N*-terminalen Region der reduktiven Enzyme 17β-HSD1 und 3 ausbilden.<sup>37,38</sup> Für die oxidativen Subtypen 2 und 4 befindet sich an dieser Stelle ein negativ geladenes Aspartat, das zu repulsiven Wechselwirkungen mit der Phosphatgruppe von NADPH führen würde. Durch die zusätzliche Möglichkeit der Ausbildung einer H-Brücke mit der freien Hydroxygruppe von NAD<sup>+</sup> erhöht sich die Bindungsaffinität.<sup>39,40</sup>

### 1.2.3 Katalytischer Mechanismus von 17 $\beta$ -HSD1

Grundsätzlich können zwei Reaktionsmechanismen in 17 $\beta$ -HSDs ablaufen. Zum einen ein Hydridtransfer vom Cofaktor NADPH auf eine Ketogruppe des Steroids in Verbindung mit einem Protonentransfer (Reduktion), zum anderen ein Hydridtransfer von einer Hydroxygruppe des Steroids auf den Cofaktor NAD<sup>+</sup> gepaart mit einem Protonentransfer (Oxidation).

Bislang wurde lediglich der Katalysemechanismus des reduktiv wirkenden 17 $\beta$ -HSD1 untersucht. Sowohl strukturelle Analysen als auch Mutageneseexperimente zeigten, dass die katalytische Triade, bestehend aus den für alle 17 $\beta$ -HSDs konservativen Aminosäuren Ser142, Tyr155 und Lys159, und ein Wassermolekül für die Katalyse essentiell sind. **Abb. 1.3** zeigt einen möglichen katalytischen Mechanismus für 17 $\beta$ -HSD1: Zunächst findet die Übertragung des pro-(*S*)-Hydrids des Cofaktors NADPH auf die Ketogruppe von E1 an Position 17 statt. Diesem Schritt folgt die Protonierung des entstandenen Oxyanions durch die Hydroxygruppe des Tyrosinrestes Tyr155, welches wiederum durch das benachbarte Lysin Lys159 protoniert wird. Letzteres wird durch ein H-Brückennetzwerk mit einem konservierten Wassermolekül und Asn114 stabilisiert.<sup>41–43</sup>



**Abb. 1.3:** Postulierter Mechanismus des Hydrid- und Protonentransfers von NADPH auf das Substrat, katalysiert durch 17 $\beta$ -HSD1 (modifiziert nach<sup>43</sup>) Übertragung des pro-(*S*)-Hydrids von NADPH auf das Substrat E1 und anschließende Protonenübertragung durch Tyr155.

## 1.3 17 $\beta$ -HSD14

17 $\beta$ -HSD14 ist das zuletzt identifizierte Mitglied der 17 $\beta$ -HSD Enzyme und trägt ebenfalls die Bezeichnungen retSDR3 und DHRS10 nach seiner Zugehörigkeit zur Familie der SDRs und seinem kodierenden Gen *DHRS10*.<sup>21,44</sup> LUKACIK *et al.* konnten durch *in vitro* Assays E2, 5-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (5-diol) und T als Substrate identifizieren, die NAD<sup>+</sup>-abhängig zu E1, Dehydroepiandrosteron und 4-Androsten-3,17-dion umgesetzt werden. Weiterhin konnte 17 $\beta$ -HSD14 als zytosolisches Enzym identifiziert werden, das ursprünglich aus dem humanen Epithel der Retina isoliert werden konnte.<sup>45</sup> Die überwiegende Genexpression findet in Gehirn, Leber, Plazenta und Nieren statt, wie es durch *Northern Blot* Analysen nachgewiesen wurde.<sup>44,45</sup> SIVIK *et al.* konnten mit Hilfe von immunochemischen Methoden eine weitere Expression des Enzyms in Geweben wie den Testikeln und den Nebennieren nachweisen.<sup>46</sup> Durch das Vorkommen in Gewebearten, die für eine lokale Umwandlung von Steroidhormonen bekannt sind und durch den beschriebenen oxidativen Wirkmechanismus, könnte die Inaktivierung von Sexualhormonen als biologische Funktion von 17 $\beta$ -HSD14 impliziert werden.<sup>18</sup> Ein weiteres Argument für die steroidogene Funktion des Subtypen 14 wurde durch JANSSON *et al.* erbracht, die einen Zusammenhang zwischen einer hohen Expression des Enzyms und der besseren Überlebensprognose von Brustkrebspatienten herstellen konnten.<sup>47</sup> Allerdings besteht ein relativ langsamer katalytischer Umsatz ( $k_{\text{cat}}$ -Wert) von E2.<sup>44</sup>

### 1.3.1 Biochemische Charakterisierung der S205- und T205-Varianten

Während das ursprünglich von HAESELLER *et al.* isolierte Gen die S205-Variante von 17 $\beta$ -HSD14 kodierte, konnte in einer Gensequenzierungskampagne eine T205-Variante aus Hautkrebszellen isoliert werden.<sup>48</sup> Im Rahmen dieses Projektes wurde von Dr. SANDRINE MARCHAIS-OBERWINKER (AK KLEBE, Philipps-Universität Marburg) ein biochemischer Vergleich der S205- und T205-Varianten durchgeführt, indem kinetische Experimente mit E2 und 5-diol als Substrate realisiert wurden.<sup>49</sup> Für diese sind die bestimmten Parameter  $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$  und  $k_{\text{cat}}$  in **Tabelle 1.1** aufgeführt.

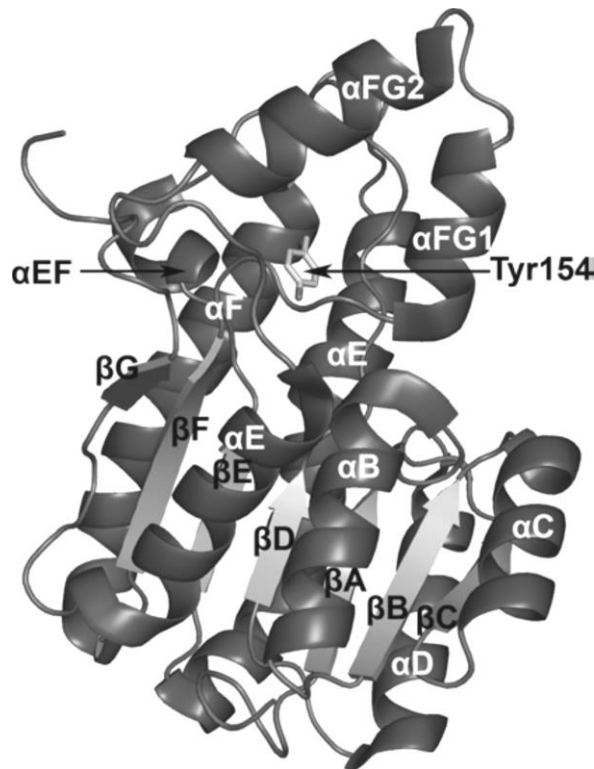
**Tabelle 1.1:** Kinetische Analyse von 17 $\beta$ -HSD14 und enzymspezifische Aktivität.

Substrat	<u>S205</u>			<u>T205</u>		
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (nM/min)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (nM/min)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
5-diol	$6.6 \pm 1.5$	$58 \pm 0.4$	0.017	$7.8 \pm 1.2$	$68 \pm 0.3$	0.019
E2	$6.2 \pm 1.4$	$82 \pm 0.1$	0.024	$7.9 \pm 1.7$	$114 \pm 0.3$	0.033

Für die S205-Variante konnte ein ähnlicher  $K_m$ -Wert erhalten werden, wie er bereits von LUKACIK *et al.*<sup>44</sup> beschrieben wurde. Die kinetischen Daten der T205-Variante ähneln denen des S205-Proteins und verdeutlichen, dass die Mutation an Position 205 keinen Einfluss auf die katalytische Wirksamkeit hat. Dies erscheint verständlich, da die Aminosäure 205 in keiner räumlichen Nähe zur katalytischen Triade steht. Der relativ hohe  $K_m$ -Wert und der niedrige Umsatz von 5-diol und E2 durch 17 $\beta$ -HSD14 wurde ebenfalls von Lukacik *et al.*<sup>44</sup> beschrieben und lässt darauf schließen, dass das Enzym andere Typen von Substraten außer Steroidhormone umsetzen könnte.

### 1.3.2 Kristallstruktur von 17 $\beta$ -HSD14

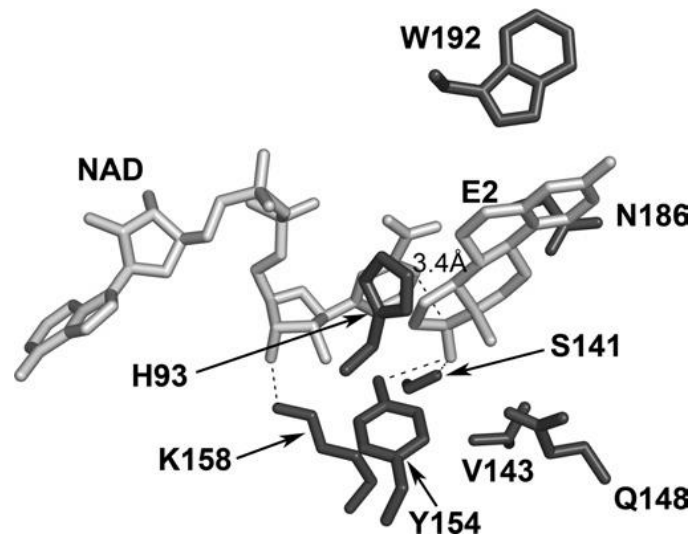
LUKACIK *et al.* ist es gelungen eine Apostruktur (PDB: 1YDE) von 17 $\beta$ -HSD14 zu beschreiben (**Abb. 1.4**):<sup>44</sup> Sie besteht aus einer asymmetrischen Einheit mit 16 Monomeren, die in vier Tetramere untergliedert sind. Jedes der Monomere beinhaltet zwei Regionen, von denen die erste durch eine ROSSMANN-Faltung aufgebaut wird. Diese gliedert sich in sieben  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta$ A- $\beta$ G) die von zwei Reihen  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ B- $\alpha$ G) umschlossen werden. In dieser für SDR-Enzyme typischen Region befindet sich das Cofaktorbindungsmotiv. Am C-terminalen Ende von  $\beta$ B ist Asp40 lokalisiert, das für die Präferenz des Cofaktors entscheidend ist und eine Selektivität von  $\text{NAD}^+$  gegenüber  $\text{NADP}^+$  bestimmt (vgl. **Abschnitt 1.2.2**). Dies unterstützt die *in vitro* durchgeführten Assays, die  $\text{NAD}^+$  als Cofaktor identifizierten (s.o.). Zusätzlich wird diese Region durch die  $\alpha$ -Helices  $\alpha$ EF,  $\alpha$ E und  $\alpha$ F ergänzt. Die zweite Region wird durch die  $\alpha$ -Helices  $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2 ausgebildet die sich zwischen  $\beta$ F und  $\alpha$ G befinden. Hierbei handelt es sich um eine zwischen den SDRs strukturell vielfältige Region, in der die Substratbindetasche zu finden ist. Zwischen diesen beiden Regionen liegt die relativ große aktive Tasche, welche die für 17 $\beta$ -HSDs typische katalytische Triade aus Ser141, Tyr154 und Lys158 beherbergt. Ferner wird die aktive Tasche durch eine Reihe von hydrophoben Aminosäuren ausgebildet, die auf die Bindung von hydrophoben Substraten schließen lässt.<sup>44</sup> Darüber hinaus berichteten die Autoren allerdings auch, dass die Raumstruktur eines Segments am C-terminalen Ende von ~14 Aminosäuren nicht aufgeklärt werden konnte.



**Abb. 1.4:** Apostruktur von 17 $\beta$ -HSD14 (PDB: 1YDE). Das Enzym ist als Bändermodell und die Seitenkette von Tyr154 als Stäbchenmodell dargestellt.<sup>44</sup>

### 1.3.3 Dockingstudien an 17 $\beta$ -HSD14

LUKACIK *et al.* führten ebenfalls Dockingstudien mit der erhaltenen Kristallstruktur (PDB: 1YDE) durch um die Interaktionen des Cofaktors und von möglichen Substraten mit dem Enzym zu untersuchen.<sup>44</sup> Dabei konnte folgende Pose mit dem Cofaktor NAD<sup>+</sup> und E2 als Substrat erhalten werden. Unter den gewählten Dockingparametern bildet E2 H-Brücken mit Ser141 und Tyr154 der katalytischen Triade aus und steht in VAN-DER-WAALS Kontakten zu His93, Val143, Gln148, Trp192 und Asn186 (**Abb. 1.5**). Generell wurde die Bindung des Substrats in der aktiven Tasche als „locker“ bezeichnet, was auf die breite und offene Struktur dieser Tasche zurückzuführen ist. Die Autoren postulieren, dass diese Beobachtung ein Grund für den niedrigen  $k_{\text{cat}}$ -Wert für die Umsetzung von E2 sein könnte. Weiterhin wäre es möglich, dass die relativ breite und offene aktive Tasche ein Hinweis für ein breites Substratspektrum von 17 $\beta$ -HSD14 ist, wie es zum Beispiel für Subtyp 10 bekannt ist. Letztendlich kann dieses Phänomen auch spezifisch für das Apoenzym sein und eine geschlossene Konformation könnte nach der Bindung von Liganden eingegangen werden.<sup>44</sup>



**Abb. 1.5:** Detaillierte Ansicht der aktiven Tasche von 17β-HSD14. Der modellierte Cofaktor NAD<sup>+</sup> und das modellierte Substrat E2 sind als hellgraue Stäbchenmodelle dargestellt. Die Seitenketten im VAN-DER-WAALS Radius um den Liganden sind als dunkelgraue Stäbchen dargestellt.<sup>44</sup>



## 1.4 Referenzen

- (1) Maser, E. Xenobiotic Carbonyl Reduction and Physiological Steroid Oxidoreduction. The Pluripotency of Several Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 421–440.
- (2) Matsunaga, T.; Shintani, S.; Hara, A. Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2006**, *21*, 1–18.
- (3) Hoffmann, F.; Maser, E. Carbonyl Reductases and Pluripotent Hydroxysteroid Dehydrogenases of the Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Superfamily. *Drug Metab. Rev.* **2007**, *39*, 87–144.
- (4) Marchais-Oberwinkler, S.; Henn, C.; Möller, G.; Klein, T.; Negri, M.; Oster, A.; Spadaro, A.; Werth, R.; Wetzel, M.; Xu, K.; Frotscher, M.; Hartmann, R. W.; Adamski, J. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases (17 $\beta$ -HSDs) as Therapeutic Targets: Protein Structures, Functions, and Recent Progress in Inhibitor Development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *125*, 66–82.
- (5) Labrie, C.; Belanger, A.; Labrie, F. Androgenic Activity of Dehydroepiandrosterone and Androstenedione in the Rat Ventral Prostate. *Endocrinology* **1988**, *123*, 1412–1417.
- (6) Labrie, F. Intracrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1991**, *78*, C113–118.
- (7) Penning, T. M. Molecular Endocrinology of Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 281–305.
- (8) Duax, W. L.; Ghosh, D.; Pletnev, V. Steroid Dehydrogenase Structures, Mechanism of Action, and Disease. *Vitam. Horm.* **2000**, *58*, 121–148.
- (9) Labrie, F.; Luu-The, V.; Lin, S. X.; Simard, J.; Labrie, C.; El-Alfy, M.; Pelletier, G.; Bélanger, A. Intracrinology: Role of the Family of 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases in Human Physiology and Disease. *J. Mol. Endocrinol.* **2000**, *25*, 1–16.
- (10) Penning, T. M. Hydroxysteroid Dehydrogenases and Pre-Receptor Regulation of Steroid Hormone Action. *Hum. Reprod. Update* **2003**, *9*, 193–205.
- (11) Le Borgne, M.; Marchand, P.; Delevoye-Seiller, B.; Robert, J. M.; Le Baut, G.; Hartmann, R. W.; Palzer, M. New Selective Nonsteroidal Aromatase Inhibitors: Synthesis and Inhibitory Activity of 2,3 or 5-(Alpha-Azolybenzyl)-1H-Indoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 333–336.
- (12) Gobbi, S.; Cavalli, A.; Rampa, A.; Belluti, F.; Piazzzi, L.; Paluszczak, A.; Hartmann, R. W.; Recanatini, M.; Bisi, A. Lead Optimization Providing a Series of Flavone Derivatives as Potent Nonsteroidal Inhibitors of the Cytochrome P450 Aromatase Enzyme. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4777–4780.
- (13) Leonetti, F.; Favia, A.; Rao, A.; Aliano, R.; Paluszczak, A.; Hartmann, R. W.; Carotti, A. Design, Synthesis, and 3D QSAR of Novel Potent and Selective Aromatase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6792–6803.

- (14) Picard, F.; Schulz, T.; Hartmann, R. W. 5-Phenyl Substituted 1-Methyl-2-Pyridones and 4'-Substituted Biphenyl-4-Carboxylic Acids. Synthesis and Evaluation as Inhibitors of Steroid-5alpha-Reductase Type 1 and 2. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 437–448.
- (15) Baston, E.; Salem, O. I. A.; Hartmann, R. W. 6-Substituted 3,4-Dihydro-Naphthalene-2-Carboxylic Acids: Synthesis and Structure-Activity Studies in a Novel Class of Human 5alpha-Reductase Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2002**, *17*, 303–320.
- (16) Aggarwal, S.; Thareja, S.; Verma, A.; Bhardwaj, T. R.; Kumar, M. An Overview on 5alpha-Reductase Inhibitors. *Steroids* **2010**, *75*, 109–153.
- (17) Langer, L. J.; Engel, L. L. Human Placental Estradiol-17 Beta Dehydrogenase. I. Concentration, Characterization and Assay. *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 583–588.
- (18) Moeller, G.; Adamski, J. Integrated View on 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *301*, 7–19.
- (19) Lin, S.-X.; Poirier, D.; Adamski, J. A Challenge for Medicinal Chemistry by the 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Superfamily: An Integrated Biological Function and Inhibition Study. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1164–1171.
- (20) Luu-The, V.; Bélanger, A.; Labrie, F. Androgen Biosynthetic Pathways in the Human Prostate. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *22*, 207–221.
- (21) Lukacik, P.; Kavanagh, K. L.; Oppermann, U. Structure and Function of Human 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *248*, 61–71.
- (22) Moeller, G.; Adamski, J. Multifunctionality of Human 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *248*, 47–55.
- (23) He, W.; Gauri, M.; Li, T.; Wang, R.; Lin, S.-X. Current Knowledge of the Multifunctional 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (HSD17B1). *Gene* **2016**, *588*, 54–61.
- (24) Lawrence, H. R.; Vicker, N.; Allan, G. M.; Smith, A.; Mahon, M. F.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. Novel and Potent 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2759–2762.
- (25) Messinger, J.; Hirvelä, L.; Husen, B.; Kangas, L.; Koskimies, P.; Pentikäinen, O.; Saarenketo, P.; Thole, H. New Inhibitors of 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *248*, 192–198.
- (26) Husen, B.; Huhtinen, K.; Saloniemi, T.; Messinger, J.; Thole, H. H.; Poutanen, M. Human Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 1 Expression Enhances Estrogen Sensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cell Xenografts. *Endocrinology* **2006**, *147*, 5333–5339.
- (27) Husen, B.; Huhtinen, K.; Poutanen, M.; Kangas, L.; Messinger, J.; Thole, H. Evaluation of Inhibitors for 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Vivo in Immunodeficient Mice Inoculated with MCF-7 Cells Stably Expressing the Recombinant Human Enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *248*, 109–113.

- (28) Ayan, D.; Maltais, R.; Roy, J.; Poirier, D. A New Nonestrogenic Steroidal Inhibitor of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I Blocks the Estrogen-Dependent Breast Cancer Tumor Growth Induced by Estrone. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 2096–2104.
- (29) <http://forendo.com>, 24.06.2017.
- (30) Wu, L.; Einstein, M.; Geissler, W. M.; Chan, H. K.; Elliston, K. O.; Andersson, S. Expression Cloning and Characterization of Human 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2, a Microsomal Enzyme Possessing 20 Alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12964–12969.
- (31) Casey, M. L.; MacDonald, P. C.; Andersson, S. 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2: Chromosomal Assignment and Progestin Regulation of Gene Expression in Human Endometrium. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 2135–2141.
- (32) Dong, Y.; Qiu, Q. Q.; Debear, J.; Lathrop, W. F.; Bertolini, D. R.; Tamburini, P. P. 17Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases in Human Bone Cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 1539–1546.
- (33) Bagi, C. M.; Wood, J.; Wilkie, D.; Dixon, B. Effect of 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Inhibitor on Bone Strength in Ovariectomized Cynomolgus Monkeys. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2008**, *8*, 267–280.
- (34) Mindnich, R.; Möller, G.; Adamski, J. The Role of 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2004**, *218*, 7–20.
- (35) Day, J. M.; Foster, P. A.; Tutill, H. J.; Schmidlin, F.; Sharland, C. M.; Hargrave, J. D.; Vicker, N.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Purohit, A. STX2171, a 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3 Inhibitor, Is Efficacious in Vivo in a Novel Hormone-Dependent Prostate Cancer Model. *Endocr. Relat. Cancer* **2013**, *20*, 53–64.
- (36) Sherbet, D. P.; Papari-Zareei, M.; Khan, N.; Sharma, K. K.; Brandmaier, A.; Rambally, S.; Chattopadhyay, A.; Andersson, S.; Agarwal, A. K.; Auchus, R. J. Cofactors, Redox State, and Directional Preferences of Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2007**, *265–266*, 83–88.
- (37) Huang, Y. W.; Pineau, I.; Chang, H. J.; Azzi, A.; Bellemare, V.; Laberge, S.; Lin, S. X. Critical Residues for the Specificity of Cofactors and Substrates in Human Estrogenic 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1: Variants Designed from the Three-Dimensional Structure of the Enzyme. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **2001**, *15*, 2010–2020.
- (38) McKeever, B. M.; Hawkins, B. K.; Geissler, W. M.; Wu, L.; Sheridan, R. P.; Mosley, R. T.; Andersson, S. Amino Acid Substitution of Arginine 80 in 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3 and Its Effect on NADPH Cofactor Binding and Oxidation/Reduction Kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1601*, 29–37.
- (39) Sherbet, D. P.; Guryev, O. L.; Papari-Zareei, M.; Mizrachi, D.; Rambally, S.; Akbar, S.; Auchus, R. J. Biochemical Factors Governing the Steady-State Estrone/Estradiol Ratios Catalyzed by

- Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases Types 1 and 2 in HEK-293 Cells. *Endocrinology* **2009**, *150*, 4154–4162.
- (40) doi:10.2210/pdb1zbq/pdb.
- (41) Puranen, T. J.; Poutanen, M. H.; Peltoketo, H. E.; Vihko, P. T.; Vihko, R. K. Site-Directed Mutagenesis of the Putative Active Site of Human 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Biochem. J.* **1994**, *304*, 289–293.
- (42) Filling, C.; Berndt, K. D.; Benach, J.; Knapp, S.; Prozorovski, T.; Nordling, E.; Ladenstein, R.; Jörnvall, H.; Oppermann, U. Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-Chain Dehydrogenases/Reductases. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25677–25684.
- (43) Ghosh, D.; Vihko, P. Molecular Mechanisms of Estrogen Recognition and 17-Keto Reduction by Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1. *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *130–132*, 637–650.
- (44) Lukacik, P.; Keller, B.; Bunkoczi, G.; Kavanagh, K.; Hwa Lee, W.; Adamski, J.; Oppermann, U. Structural and Biochemical Characterization of Human Orphan DHRS10 Reveals a Novel Cytosolic Enzyme with Steroid Dehydrogenase Activity. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 419–427.
- (45) Haeseleer, F.; Palczewski, K. Short-Chain Dehydrogenases/Reductases in Retina. *Methods Enzymol.* **2000**, *316*, 372–383.
- (46) Sivik, T.; Vikingsson, S.; Gréen, H.; Jansson, A. Expression Patterns of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase 14 in Human Tissues. *Horm. Metab. Res.* **2012**, *44*, 949–956.
- (47) Jansson, A. K.; Gunnarsson, C.; Cohen, M.; Sivik, T.; Stål, O. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase 14 Affects Estradiol Levels in Breast Cancer Cells and Is a Prognostic Marker in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11471–11477.
- (48) Strausberg, R. L.; Feingold, E. A.; Grouse, L. H.; Derge, J. G.; Klausner, R. D.; Collins, F. S.; Wagner, L.; Shenmen, C. M.; Schuler, G. D.; Altschul, S. F.; Zeeberg, B.; Buetow, K. H.; Schaefer, C. F.; Bhat, N. K.; Hopkins, R. F.; Jordan, H.; Moore, T.; Max, S. I.; Wang, J.; Hsieh, F.; Diatchenko, L.; Marusina, K.; Farmer, A. A.; Rubin, G. M.; Hong, L.; Stapleton, M.; Soares, M. B.; Bonaldo, M. F.; Casavant, T. L.; Scheetz, T. E.; Brownstein, M. J.; Usdin, T. B.; Toshiyuki, S.; Carninci, P.; Prange, C.; Raha, S. S.; Loquellano, N. A.; Peters, G. J.; Abramson, R. D.; Mullahy, S. J.; Bosak, S. A.; McEwan, P. J.; McKernan, K. J.; Malek, J. A.; Gunaratne, P. H.; Richards, S.; Worley, K. C.; Hale, S.; Garcia, A. M.; Gay, L. J.; Hulyk, S. W.; Villalon, D. K.; Muzny, D. M.; Sodergren, E. J.; Lu, X.; Gibbs, R. A.; Fahey, J.; Helton, E.; Kettelman, M.; Madan, A.; Rodrigues, S.; Sanchez, A.; Whiting, M.; Madan, A.; Young, A. C.; Shevchenko, Y.; Bouffard, G. G.; Blakesley, R. W.; Touchman, J. W.; Green, E. D.; Dickson, M. C.; Rodriguez, A. C.; Grimwood, J.; Schmutz, J.; Myers, R. M.; Butterfield, Y. S. N.; Krzywinski, M. I.; Skalska, U.; Smailus, D. E.; Schnierch, A.; Schein, J. E.; Jones, S. J. M.; Marra, M. A.; Mammalian Gene Collection Program Team. Generation and Initial Analysis of More than 15,000 Full-Length Human and Mouse cDNA Sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16899–16903.

- (49) Bertoletti, N.; Braun, F.; Lepage, M.; Möller, G.; Adamski, J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. New Insights into Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14: First Crystal Structures in Complex with a Steroidal Ligand and with a Potent Nonsteroidal Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 6961–6967.



# Motivation und Aufgabenstellung



Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde, besitzt 17 $\beta$ -HSD14 die Eigenschaft in bestimmten Geweben die lokalen Konzentrationen an aktiven Steroidhormonen (E2 und T) analog zu 17 $\beta$ -HSD2 senken zu können. Durch die teilweise unterschiedliche Gewebeverteilung beider Enzyme postulierten LUKACIK *et al.* eine von 17 $\beta$ -HSD2 abweichende gewebspezifische Funktion von 17 $\beta$ -HSD14 in Kompartimenten wie dem Gehirn. Dennoch ist die physiologische Rolle des Enzyms nicht vollständig aufgeklärt und die Frage nach dem natürlichen Substrat nicht zweifelsfrei beantwortet.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Synthese von potenten und selektiven nichtsteroidalen Inhibitoren der 17 $\beta$ -HSD14. Diese sind in der Literatur bisher nicht bekannt und sollten eine weitere strukturelle Charakterisierung des Enzyms ermöglichen. Vielmehr sollten sie aber zu *tool compounds* weiterentwickelt werden, um die physiologische Rolle des Enzyms im Hinblick auf eine in der Zukunft geplanten *in vivo* Verabreichung der Inhibitoren untersuchen zu können.

Die in **Abschnitt 1.3** vorgestellte Apostruktur von 17 $\beta$ -HSD14 zeigte eine relativ weit geöffnete Substratbindetasche, die nicht mit ausreichender Sicherheit als aktive Konformation angenommen werden konnte. Somit war an dieser Stelle eine strukturbasierte Entwicklung von Inhibitoren basierend auf der Proteinstruktur nicht möglich. Stattdessen sollten zunächst in einem ligandenbasierten Ansatz von der AG R. W. HARTMANN (Universität des Saarlandes) entwickelte Inhibitoren der Subtypen 1 und 2 als mögliche Leitstrukturen dienen und optimiert werden. Durch eine enge Zusammenarbeit mit NICOLE BERTOLETTI (AG KLEBE, Philipps-Universität Marburg) sollten Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit den synthetisierten Inhibitoren erhalten werden. Die dadurch ermöglichte strukturbasierte Modifikation sollte eine Erhöhung der Affinität zum Subtypen 14 ermöglichen und die Selektivität gegenüber den Subtypen 1 und 2 sowie zu den Rezeptoren ER $\alpha$  und  $\beta$  gewährleisten. Ferner sollte die Entwicklung von abweichenden Strukturgerüsten ermöglicht werden, um unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften der potentiellen Inhibitoren hervorzubringen.

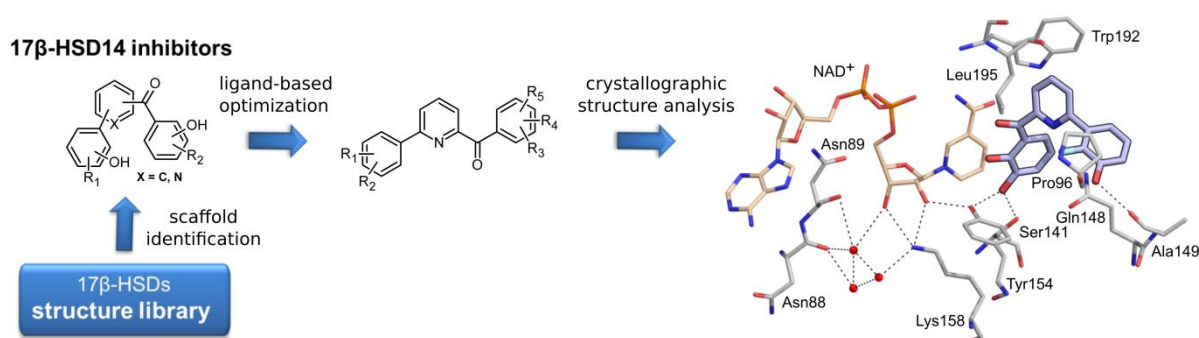
Im weiteren Verlauf sollten ebenfalls unabhängige Leitstrukturen in einem fragmentbasierten Ansatz gefunden und bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 optimiert werden.





# Identifikation der ersten nichtsteroidalen 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren

# 3



## Anmerkung

Das folgende Kapitel basiert auf einem Artikel, der im *Journal of Medicinal Chemistry* publiziert wurde: First Structure-Activity Relationship of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14 Nonsteroidal Inhibitors and Crystal Structures in Complex with the Enzyme, Braun, F.; Bertoletti, N. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 10719–10737.

Teile dieses Kapitels (Kristallstrukturanalysen) basieren auf einem weiteren Artikel, der im *Journal of Medicinal Chemistry* publiziert wurde: New Insights into Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14, Bertoletti, N.; Braun, F. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 6961-6967.

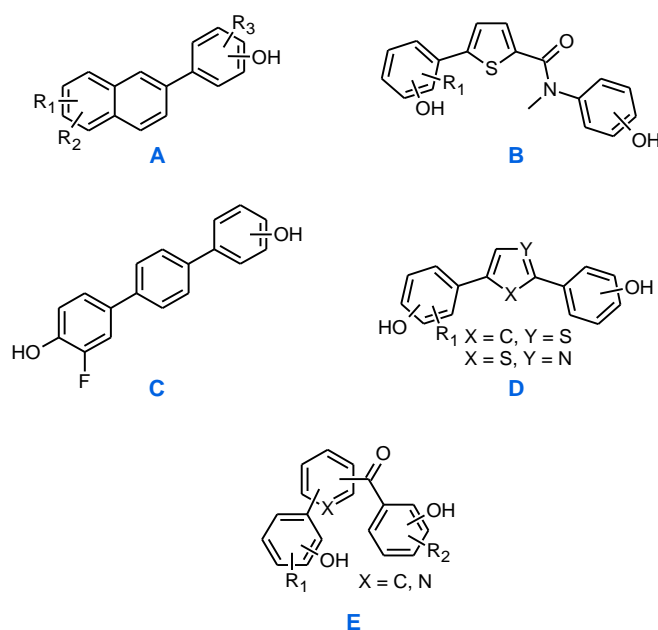
Der Autor dieser Arbeit war an der Interpretation aller Ergebnisse beteiligt und hat das Inhibitor-Designkonzept entwickelt. Er war für die Planung, Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung aller neuen Verbindungen verantwortlich. Weiterhin war er an der Durchführung der Aktivitätsassays für das Target 17 $\beta$ -HSD14 beteiligt und hat zum Konzipieren und Verfassen der Manuskripte beigetragen.

### 3.1 Zusammenfassung

Das Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Arbeit war es nichtsteroidale 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren zu identifizieren und deren Strukturen zu optimieren, was in hochpotenten Inhibitoren resultierte. Die Optimierung der Inhibitoren folgte einem ligandenbasierten Ansatz. Die Synthese und biologische Auswertung von sehr aktiven Verbindungen mit einem nichtsteroidalen Grundgerüst wurden zusammen mit fünf Kristallstrukturen der ternären Komplexe beschrieben. Weiterhin konnten Kristallstrukturen mit 17 $\beta$ -HSD14 als Apoenzym (Variante S205) und als binärer Komplex mit NAD<sup>+</sup> (Varianten S205 und T205) erhalten werden. Die Analyse dieser ersten Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit verschiedenen Liganden zeigte, dass das Enzym in einer „geschlossenen“ Cofaktor-gebundenen Konformation bzw. als Apoenzym in einer „offenen“ Konformation vorliegt. Die Lokalisation der Inhibitorbindetasche, sowie die resultierenden Protein-Inhibitor Interaktionen konnten ermittelt werden. Weiterhin wurde ein komplexes H-Brückennetzwerk aufgedeckt, welches zu der hohen Affinität der synthetisierten Inhibitoren zum Enzym beiträgt. Zudem wurden die physikochemischen Eigenschaften, als auch die Untersuchung der Selektivität der Inhibitoren gegenüber weiterer 17 $\beta$ -HSD Subtypen beschrieben.

## 3.2 Design von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren

Obwohl die Vertreter der 17 $\beta$ -HSDs zu derselben Enzymfamilie gehören, teilen sie nur eine geringe Sequenzidentität in ihren codierenden Genen. Da 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 dennoch die gleiche Reaktion wie 17 $\beta$ -HSD14 katalysieren können, sollten die aktiven Zentren dieser Enzyme eine starke Ähnlichkeit in ihren Strukturen aufweisen. Es wurde daher angenommen, dass einige Inhibitoren der Subtypen 1 und 2 in das aktive Zentrum des Zielproteins binden und somit bekannte Strukturtypen dieser Inhibitoren als Startpunkt zur Optimierung der Bindung an 17 $\beta$ -HSD14 dienen konnten. In einer vorangegangenen Studie wurden von Dr. SANDRINE MARCHAIS-OBERWINKLER (AG KLEBE, Philipps-Universität Marburg) in Zusammenarbeit mit Dr. GABRIELE MÖLLER (AG ADAMSKI, Helmholtz Zentrum München) eine Gruppe von 34 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 Inhibitoren auf ihre Hemmwirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 getestet. Die Substanzen wurden von Prof. Dr. ROLF HARTMANN (Universität des Saarlandes) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Inhibitoren wurden auf der Grundlage struktureller Unterschiede ausgewählt. Hierbei konnte eine Reihe von aktiven und inaktiven Verbindungen identifiziert werden, die in **Abb. 3.1** dargestellt sind.

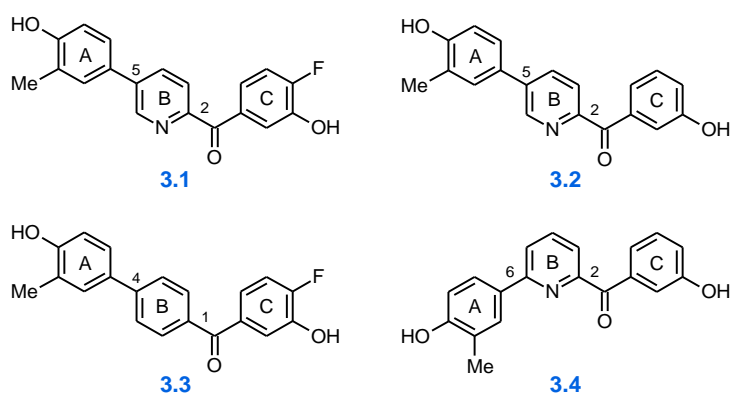


**Abb. 3.1:** Getestete Strukturklassen von 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 Inhibitoren auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14.

Während in den Klassen der getesteten Naphthalene **A**<sup>1,2</sup> und Thiophenamide **B**<sup>3</sup> hauptsächlich inaktive Verbindungen zu finden waren, brachten die Dihydroxyphenylbenzene **C**<sup>4</sup>, -thiophene und -thiazole **D**<sup>4</sup> Beispiele von Inhibitoren mit schwacher bis moderater inhibitorischer Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 hervor (10-45% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Weiterhin wurde für einige der zuletzt

genannten Verbindungen eine hohe Potenz gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 und/oder 17 $\beta$ -HSD2 berichtet (IC<sub>50</sub> im niederen nanomolaren Bereich), was die Entwicklung von selektiven 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren zusätzlich erschwert hätte. Somit wurden diese Strukturklassen für eine weitere Optimierung ausgeschlossen. In der Klasse der Pyridin- und Phenylketone **E**<sup>5</sup> konnten jedoch Vertreter gefunden werden, die sowohl beträchtliche inhibitorische Wirkung gegenüber dem Target aufwiesen, als auch eine lediglich schwache bis moderate Aktivität gegenüber dem Subtypen 1 (**3.1**, **Tabelle 3.1**). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde diese Strukturklasse als vielversprechender Startpunkt für die Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren ausgewählt. Die interessantesten Verbindungen aus der vorangegangenen Studie sind in **Tabelle 3.1** zusammengefasst.

**Tabelle 3.1:** Interessanteste Verbindungen der vorangegangenen Studie.



Verb.	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 1 $\mu$ M) <sup>a</sup>	17 $\beta$ -HSD1 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>b</sup>	17 $\beta$ -HSD2 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>c</sup>
<b>3.1</b>	62	1.27	0.10
<b>3.2</b>	0	5.48	0.26
<b>3.3</b>	19	0.29	0.04
<b>3.4</b>	32	19.65	0.26

<sup>a</sup> Rekombinantes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, bakterielle Suspension, Substrat [<sup>3</sup>H]-E2 [18.3 nM], NAD<sup>+</sup> [7.5 mM], Mittelwert aus drei Messungen; Standardabweichung < 10%. <sup>b</sup> 17 $\beta$ -HSD1 Enzyme aus Plazenta, zytosolische Fraktion, Substrat [<sup>3</sup>H]-E1 + E1 [500 nM], NADH [0.5 mM], Mittelwert aus drei Messungen; Standardabweichung < 10%. <sup>c</sup> 17 $\beta$ -HSD1 Enzyme aus Plazenta, mikrosomale Fraktion, Substrat [<sup>3</sup>H]-E2 + E2 [500 nM], NAD<sup>+</sup> [1.5 mM], Mittelwert aus drei Messungen; Standardabweichung < 10%.

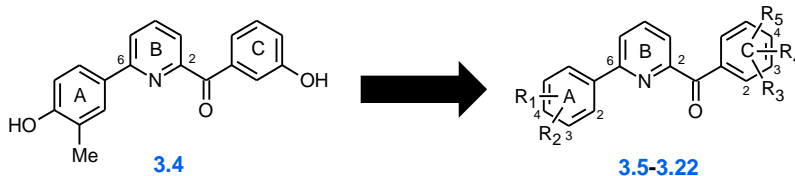
Die Verbindungen können in 2,5- (**3.1**, **3.2**) und 2,6-substituierte (**3.4**) Pyridinketone und in das 1,4-substituierte Phenylketon (**3.3**) unterteilt werden. In der 2,5-substituierten Klasse unterscheiden sich Verbindungen **3.1** und **3.2** (62% gegenüber 0% Inhibition bei 1  $\mu$ M) durch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines Fluoratoms in *ortho*-Position zur Hydroxygruppe am C-ring. Die Wichtigkeit dieses Atoms in Bezug auf die inhibitorische Aktivität wird durch diesen Vergleich hervorgehoben.

Weiterhin kann durch die Gegenüberstellung der Verbindungen **3.1** und **3.3** (62% gegenüber 19% Inhibition bei 1  $\mu$ M) gezeigt werden, dass der Pyridin B-Ring zu einem potenteren Inhibitor gegenüber seinem Phenylanalogon führt. Außerdem lässt der Vergleich der Verbindungen **3.2** und **3.4** (0% gegenüber 32% Inhibition bei 1  $\mu$ M) darauf schließen, dass ein A-Ring in 6-Position zu einem Gewinn an Aktivität führt. Bei der Betrachtung der Selektivitäten kann beobachtet werden, dass die 2,6-substituierte Verbindung **3.4** eine niedrige inhibitorische Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 aufweist ( $IC_{50}$  = 16.65  $\mu$ M), während das 2,5-substituierte Analogon **3.2** eine höhere Aktivität besitzt ( $IC_{50}$  = 5.48  $\mu$ M). Somit ist anzunehmen, dass das 2,6-Substitutionsmuster zu einem Selektivitätsvorteil gegenüber dem Subtypen 1 führt. Ein Ansatz zur Erhöhung der Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 kann anhand der getesteten Verbindungen nicht gefunden werden.

Dennoch wurde die 2,6-Pyridinketonklasse zur Optimierung der Inhibitoren ausgewählt. Bei den durchgeführten Modifikationen wurde eine besondere Aufmerksamkeit auf die physikochemischen Eigenschaften der zu synthetisierenden Verbindungen gelegt, um eine ausreichende Bioverfügbarkeit nach den „VEBER *rules*“ und „LIPINSKI'S *rule of five*“ zu ermöglichen.<sup>6,7</sup>

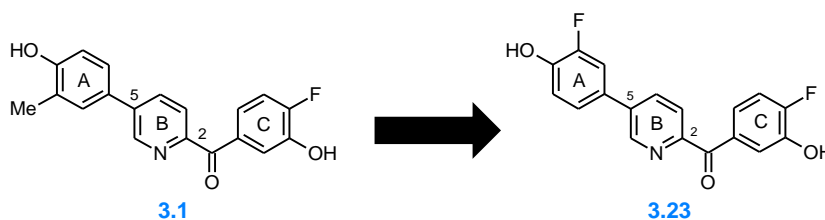
### Überblick der durchgeführten Modifikationen

Ausgehend von der „*hit*“-Verbindung, dem Pyridinketon **3.4**, sollten Modifikationen am A- und am C-Ring durchgeführt werden. Im Hinblick auf unterschiedliche chemische Eigenschaften wurden verschiedene Substituenten ( $R_1$ - $R_5$ ) in variierenden Positionen an den Phenylringen (A und C) angefügt. Von besonderem Interesse war dabei unter anderem, ob auch in der Klasse der 2,6-Pyridinketone das für Verbindung **3.1** beobachtete Fluoratom in *ortho*-Position zur 3-OH Gruppe am C-Ring von großer Bedeutung ist. In diesem Zuge wurde die Literaturbekannte Verbindung **3.5**<sup>5</sup> herangezogen und zusätzlich wurden die Verbindungen **3.6-3.22** dargestellt und untersucht.

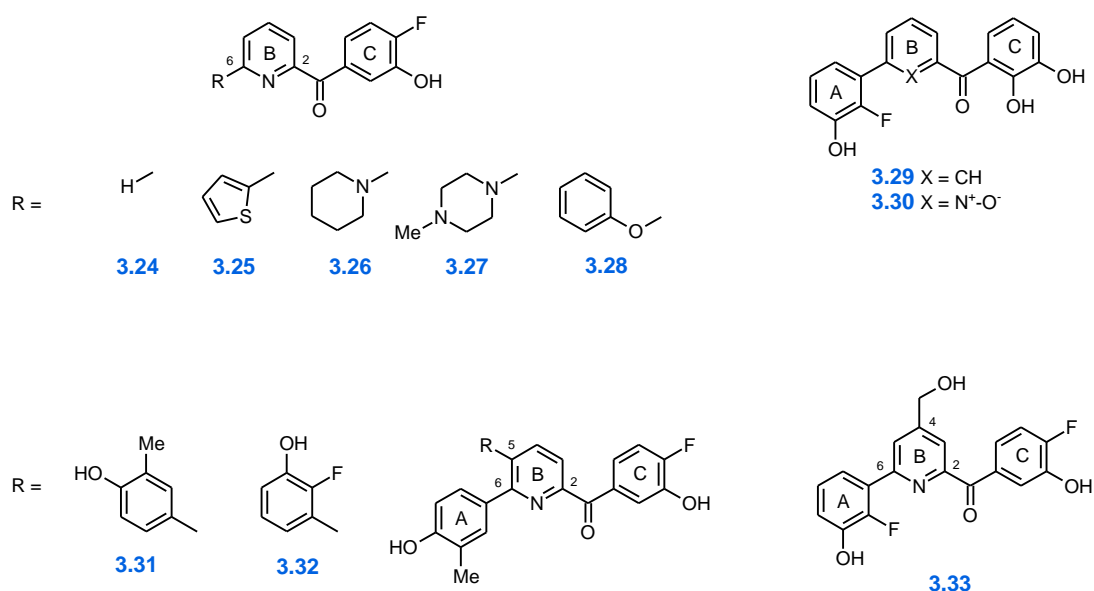
**Tabelle 3.2:** Verbindungen mit Modifikationen am A- und am C-Ring ausgehend von Verbindung **3.4**.


Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>3.5</b>	3-F	4-OH	H	3-OH	H
<b>3.6</b>	3-Me	4-OH	H	3-OH	4-F
<b>3.7</b>	3-F	4-OH	H	3-OH	4-F
<b>3.8</b>	2-F	3-OH	H	3-OH	4-F
<b>3.9</b>	2-F	3-OH	2-OH	3-OH	4-F
<b>3.10</b>	2-F	3-OH	2-F	3-OH	4-F
<b>3.11</b>	2-F	3-OH	2-OH	3-OH	H
<b>3.12</b>	2-F	3-OH	2-OH	H	H
<b>3.13</b>	2-F	3-OH	2-OH	3-OH	4-OH
<b>3.14</b>	2-F	3-OH	2-OH	3-OH	6-OH
<b>3.15</b>	H	H	H	3-OH	4-F
<b>3.16</b>	3-NMe <sub>2</sub>	H	H	3-OH	4-F
<b>3.17</b>	3-OH	H	H	3-OH	4-F
<b>3.18</b>	H	3-OH	2-OH	3-OH	H
<b>3.19</b>	H	4-F	H	3-OH	4-F
<b>3.20</b>	3-Cl	4-F	H	3-OH	4-F
<b>3.21</b>	3-OH	4-OH	H	3-OH	4-F
<b>3.22</b>	3-OH	4-Me	H	3-OH	4-F

Auch wenn Verbindung **3.1** als Vertreter der 2,5-Pyridinketonklasse eine geringe Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 zeigt, sollte eine weitere Verbindung (**3.23**) in dieser Klasse synthetisiert werden um diesen beobachteten Trend bestätigen zu können (**Abb. 3.2**).


**Abb. 3.2:** Design von Verbindung **3.23** als weiterer Vertreter der 2,5-Pyridinketonklasse.

Ferner sollten unterschiedliche Substituenten in 6-Position des Pyridinrings eingeführt werden, um die Rolle des aromatischen A-Rings von Ausgangsverbindung **3.4** zu untersuchen (**3.24-3.28**). Ebenfalls war es das Ziel die Rolle des Pyridinrings als Kernbaustein weiter auszuloten, für den in der 2,5-Pyridinketonklasse eine Präferenz dieses Heterozyklus gegenüber einem Phenylring beobachtet werden kann (Vergleich von Verbindungen **3.1** und **3.3**). Diese Feststellung sollte analog für die 2,6-substituiert Klasse durch die Synthese eines 1,3-substituierten Benzolderivats (**3.29**) analysiert werden. Weiterhin wurde der Pyridinkern in ein *N*-Oxid (**3.30**) überführt um die mögliche Ausbildung und Bedeutung zusätzlicher Interaktionen zu dem Protein zu untersuchen. Zusätzlich sollte im Rahmen der aufzustellenden Struktur-Wirkungsbeziehung ein weiterer Phenylring mit unterschiedlichen Substituenten in 5-Position, sowie ein hydrophiler Substituent in Position 4 des 2,6-substituierten Pyridinrings eingefügt werden (**3.31-3.33**). In **Abb. 3.3** ist ein Überblick der in diesem Ansatz dargestellten Verbindungen zu finden.



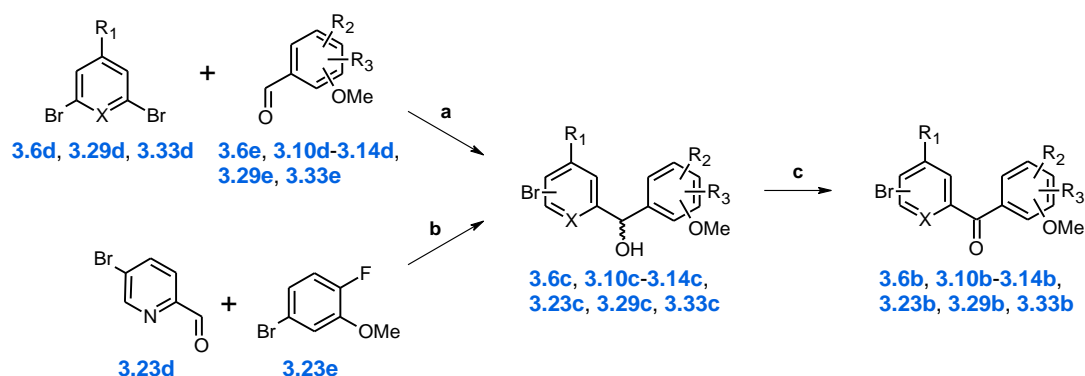
**Abb. 3.3:** Änderung der Substituenten und Einführung zusätzlicher Substituenten am B-Ring und Austausch des Pyridinkerns.

### 3.3 Synthese

#### Synthese der Inhibitoren 3.6-3.8, 3.10-3.23, 3.25, 3.29 und 3.33

Zur Darstellung der Inhibitoren 3.6-3.8, 3.10-3.23, 3.25, 3.29 und 3.33 erfolgte zunächst die Synthese der Vorstufen 3.6b, 3.10b-3.14b, 3.23b, 3.29b und 3.33b. Ausgehend von den Dibromopyridinen 3.6d und 3.33d beziehungsweise ausgehend vom Benzenanalogon 3.29d lieferte die Lithiierung mit *n*-Butyllithium (*n*-BuLi)<sup>8</sup> nach anschließender nukleophiler Addition an das entsprechende Aldehyd die Alkohole 3.6c, 3.10c-3.14c, 3.29c und 3.33c. Für die Synthese von 3.23b wurde ausgehend vom Arylbromid 3.23e das entsprechende GRIGNARD-Reagenz *in situ* dargestellt, welches in einer nukleophilen Reaktion mit dem Aldehyd 3.23d umgesetzt wurde. Das entstandene Alkohol 3.23c wurde, wie auch Verbindungen 3.6c, 3.10c-3.14c, 3.29c und 3.33c mit 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) zu den entsprechenden Ketonen 3.6b, 3.10b-3.14b, 3.23b, 3.29b und 3.33b oxidiert (Schema 1). Über zwei Stufen konnten dabei sehr gute Ausbeuten von 60-75% erzielt werden, wobei sich die GRIGNARD-Reaktion zum Alkohol 3.23c mit einer annehmbaren Ausbeute (36%) durchführen ließ.

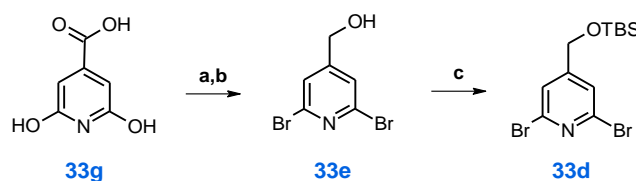
**Schema 1:** Synthese der Vorstufen 3.6b, 3.10b-3.14b, 3.23b, 3.29b und 3.33b.



Bedingungen: a) *n*-BuLi, THF<sub>abs.</sub>, -80 °C → RT, 1 h; b) Mg, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, 2 h, 80 °C, 5 h; c) IBX, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, 2-4 h.

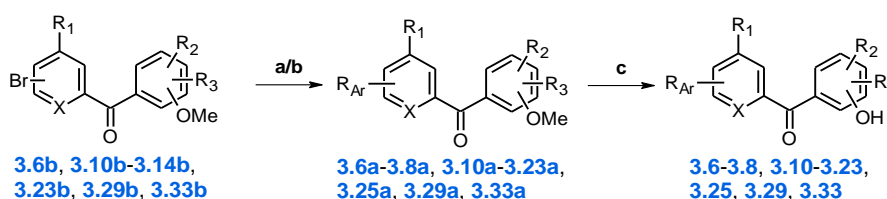
Verbindung 3.33d wurde ausgehend Citrazinsäure (3.33g) dargestellt, indem diese Substanz zunächst mit Phosphoroxidbromid bromiert wurde und dann mit Methanol umgesetzt wurde. Die Reduktion des gebildeten Esters<sup>9</sup> und die Schützung des resultierenden Alkohols 3.33e mit TBSCl lieferte Verbindung 3.33d in einer guten Ausbeute von 41% über drei Stufen (Schema 2).



**Schema 2:** Synthese der Verbindung **3.33d**.


Bedingungen: **a)** i) POBr<sub>3</sub>, 130 °C, 0.5 h, 150 °C, 1.5 h, ii) MeOH, RT, über Nacht; **b)** NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 85 °C, 3 h; **c)** TBSCl, Imidazol, DMF, RT, 18 h.

Ausgehend von den Vorstufen **3.6b**, **3.10b-3.14b**, **3.23b**, **3.29b** und **3.33b** wurden SUZUKI-MIYAUURA-Reaktionen<sup>10</sup> mit verschiedenen Arylboronsäuren durchgeführt um die Verbindungen **3.6a-3.8a**, **3.10a-3.23a**, **3.25a**, **3.29a** und **3.33a** zu erhalten. Dabei wurden entweder konventionelle Bedingungen gewählt, oder das System wurde Mikrowellenbestrahlung ausgesetzt um durchgehend sehr gute bis hervorragende Ergebnisse zu erzielen (74-97% Ausbeute). Die Spaltung der Methoxyether erfolgte mittels Bortribromid (BBr<sub>3</sub>) und führte zu den Inhibitoren **3.6-3.8**, **3.10-3.23**, **3.25**, **3.29** und **3.33** mit durchschnittlichen Ausbeuten von ca. 70 % (**Schema 3**).

**Schema 3:** Synthese der Verbindungen **3.6-3.8**, **3.10-3.23**, **3.25**, **3.29** und **3.33**.


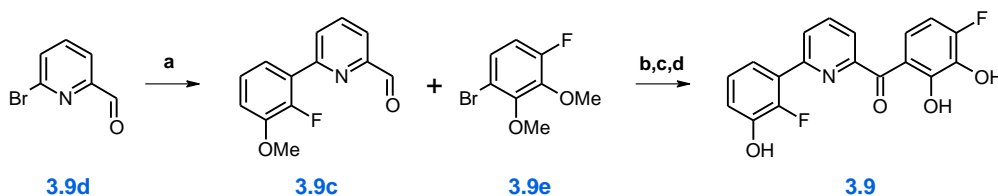
Bedingungen: **a)** Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, R<sub>Ar</sub>B(OH)<sub>2</sub>, DME/H<sub>2</sub>O (2:1), 80 °C, über Nacht, für **3.6a-3.8a**, **3.11a-3.14a**, **3.16a-3.18a**, **3.20a-3.23a**, **3.25a**, **3.29a** und **3.33a**; **b)** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, R<sub>Ar</sub>B(OH)<sub>2</sub>, DME/H<sub>2</sub>O (2:1),  $\mu$ W, 150 W, 150 °C, 1 h, für **3.10a**, **3.15a** und **3.19a**; **c)** BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht.

**Synthese des Inhibitors 3.9**

Die Synthese des am C-Ring trisubstituierten Derivats **3.9** wurde ausgehend von 6-Brompyridin-2-carbaldehyd **3.9d** in vier Stufen ermöglicht (**Schema 4**). Die SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure lieferte im ersten Schritt den Aldehyd **3.9c** in sehr guter Ausbeute (79%). Die nukleophile Addition nach Lithiierung des Arylbromids **3.9e** mit *n*-BuLi, die anschließende Oxidation des gebildeten Alkohols mit IBX und die Spaltung der Methoxygruppen lieferte die gewünschte Endverbindung **3.9** in moderater Ausbeute über drei Stufen. Hierbei stellte sich die Bildung des Alkohols mit einer Ausbeute von 27% als limitierender Faktor dieser Reaktionssequenz heraus. Die Durchführung einer GRINGARD-Reaktion als Alternative lieferte das

Zwischenprodukt sogar in schlechteren Ausbeuten, wobei Nebenprodukte durch die Spaltung von Methoxygruppen identifiziert werden konnten.

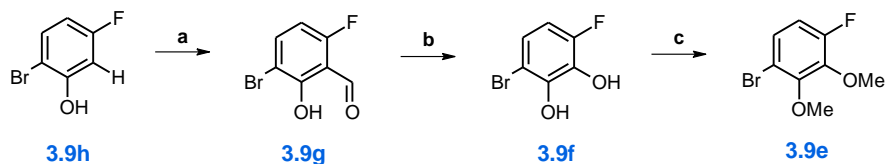
**Schema 4:** Synthese von Verbindung **3.9**.



Bedingungen: **a)**  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{R}_{\text{Ar}}\text{B}(\text{OH})_2$ ,  $\text{DME}/\text{H}_2\text{O}$  (2:1), 80 °C, über Nacht; **b)**  $n\text{-BuLi}$ ,  $\text{THF}_{\text{abs.}}$ , -80 °C  $\rightarrow$  RT, 1 h; **c)** IBX,  $\text{THF}_{\text{abs.}}$ , 60 °C, 3-4 h; **d)**  $\text{BBr}_3$ , DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht.

Das Arylbromid **3.9e** wurde nach einer dreistufigen Reaktionssequenz erhalten (**Schema 5**), bei der im ersten Schritt 2-Brom-5-fluorphenol **3.9h** in einer CASIRAGHI-Formylierung mit Paraformaldehyd in der Anwesenheit von Magnesiumchlorid und Triethylamin umgesetzt wurde.<sup>11</sup> Dabei konnten Ausbeuten von bis zu 69% erzielt werden. Der gebildete Aldehyd **3.9g** wurde anschließend in einer DAKIN-Reaktion mit Wasserstoffperoxid und Natriumhydroxid umgesetzt<sup>12</sup> und das gebildete Dihydroxyderivat **3.9f** wurde mit Methyljodid geschützt um das gewünschte Arylbromid **3.9e** in ausreichender Ausbeute (30%) über drei Stufen zu erhalten.

**Schema 5:** Synthese der Vorstufe **3.9e**.



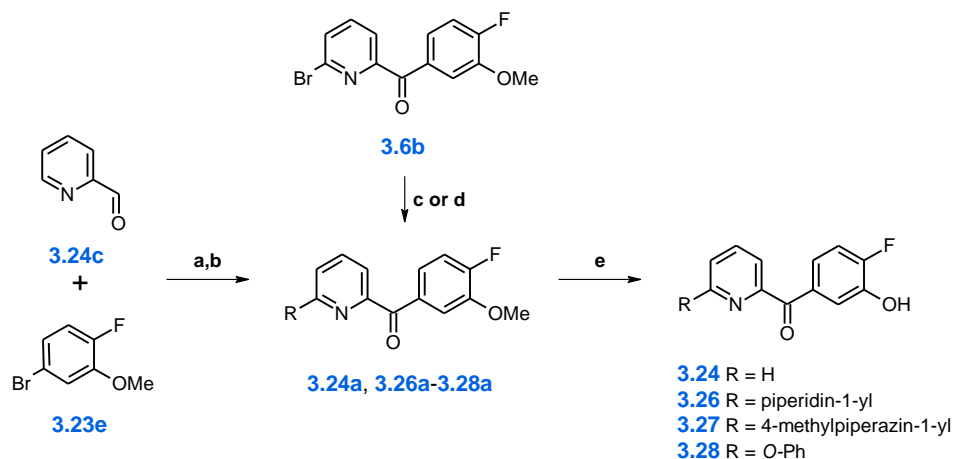
Bedingungen: **a)**  $(\text{CHO})_n$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{THF}_{\text{abs.}}$ , 80 °C, 5 h; **b)** 1.0 M  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , THF, RT, 4 h; **c)** MeI,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, RT, über Nacht.

**Synthese der Verbindungen 3.24 und 3.26-3.28**

Die Synthese der um den A-Ring verkürzten Verbindung **3.24** (**Schema 6**) erfolgte durch die GRIGNARD-Reaktion des Aldehyds **3.24c** mit dem Arylbromid **3.23e** und der anschließenden Oxidation des Alkohols zum Keton **3.24a**, wie es bereits für vorherige Versuchsvorschriften beschrieben wurde. Die Darstellung der Verbindungen **3.26** und **3.27** konnte im ersten Schritt durch die Aminierung der Vorstufe **3.6b** mit den entsprechenden nichtaromatischen *N*-Heterozyklen nach einer Vorschrift von BOLLINGER *et al.*<sup>13</sup> realisiert werden, um zunächst zu den Vorstufen **3.26a** und **3.27a** in guten Ausbeuten (73% bzw. 55%) zu gelangen. Zur Synthese der etherverbrückten Verbindung **3.28** wurde Verbindung **3.6b** in einer kupferkatalysierten *O*-Arylierung mit Picolinsäure

als Ligand umgesetzt,<sup>14</sup> um zunächst Verbindung **3.28a** mit einem annehmbaren Ergebnis (30% Ausbeute) zu erhalten. Alle Methoxygruppen der zuvor beschriebenen Verbindungen wurden mit Hilfe von BBr<sub>3</sub> gespalten, um die Inhibitoren **3.24** und **3.26-3.28** mit ähnlichen Ergebnissen wie zuvor beschrieben zu erhalten.

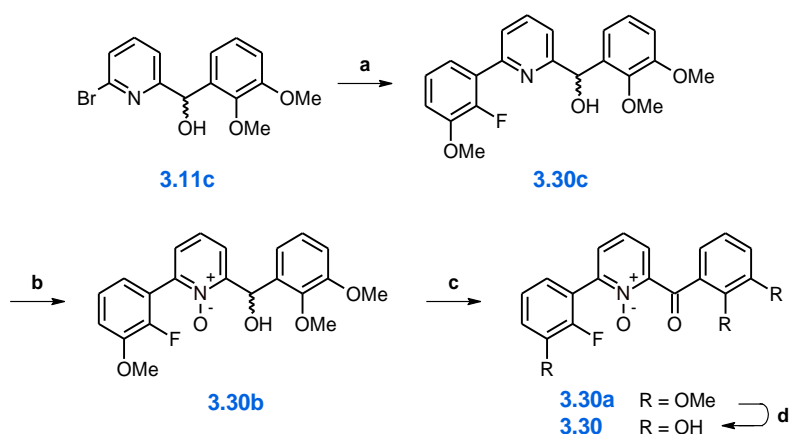
**Schema 6:** Synthese der Verbindungen **3.24** und **3.26-3.28**.



Bedingungen: **a)** Mg, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, 2 h, 80 °C, 5 h; **b)** IBX, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, 3-4 h; **c)** *N*-Heterozyklen, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4-Dioxan, 100 °C, 2-4 d, für **3.26a** und **3.27a**; **d)** Cu(I)I, Picolinsäure, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, DMSO, 80 °C, 3 d, für Verbindung **3.28a**; **e)** BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C → RT, über Nacht.

### Synthese des Pyridin-*N*-Oxids **3.30**

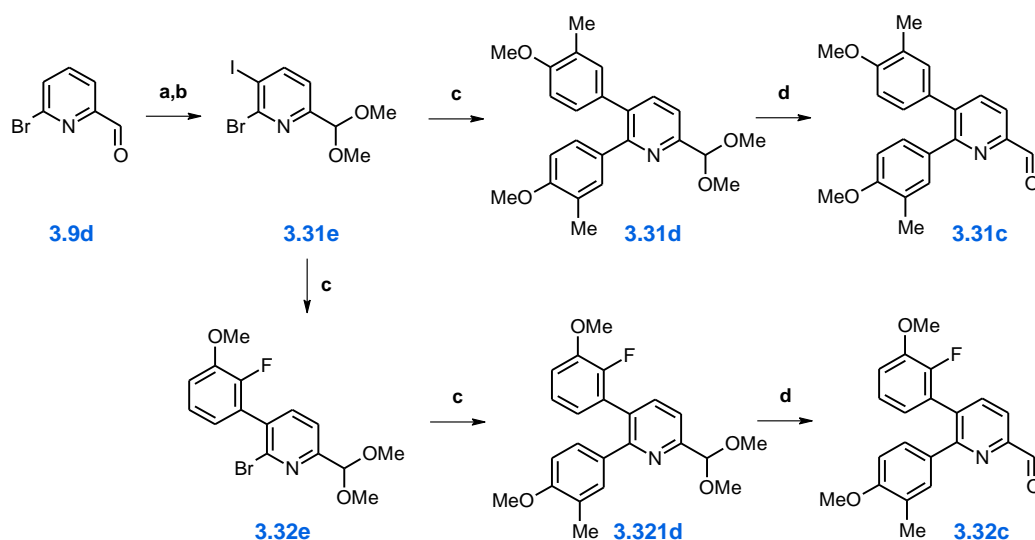
Die Oxidation des Pyridinstickstoffs mit *meta*-Chlorperoxibenzoesäure (*m*-CPBA) kann nicht in Anwesenheit einer Carbonylfunktion erfolgen, da diese über eine BAEYER-VILLIGER-Oxidation<sup>15</sup> mit Peroxiden reagieren würde. Somit wurde die Synthese des Pyridin-*N*-Oxids **3.30** ausgehend vom zuvor beschriebenen Alkohol **3.11c** in vier Stufen durchgeführt (**Schema 7**). Die SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung mit 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure lieferte Verbindungen **3.30c** mit ausgezeichneter Ausbeute (92%). Die Oxidation zum Pyridin-*N*-Oxid **3.30b** erfolgte mit Hilfe von *m*-CPBA und die anschließende Bildung des Ketons **3.30a** wurde mittels IBX durchgeführt. Die Spaltung der Methoxygruppen wurde mit Bortrifluorid-Methylsulfid Komplex (BF<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>) ermöglicht und lieferte das Endprodukt **3.30**. Für alle Teilreaktionen konnten gute Ergebnisse erzielt werden (77, 60 und 61% Ausbeute).

**Schema 7:** Synthese des *N*-Oxids **3.30**.


Bedingungen: **a**)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure, DME/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1), 80 °C, über Nacht; **b**) *m*-CPBA (77%), DCM, 0 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht; **c**) IBX,  $\text{THF}_{\text{abs.}}$ , 60 °C, 2 h; **d**)  $\text{BF}_3 \cdot \text{SMe}_2$ , DCM, RT, über Nacht.

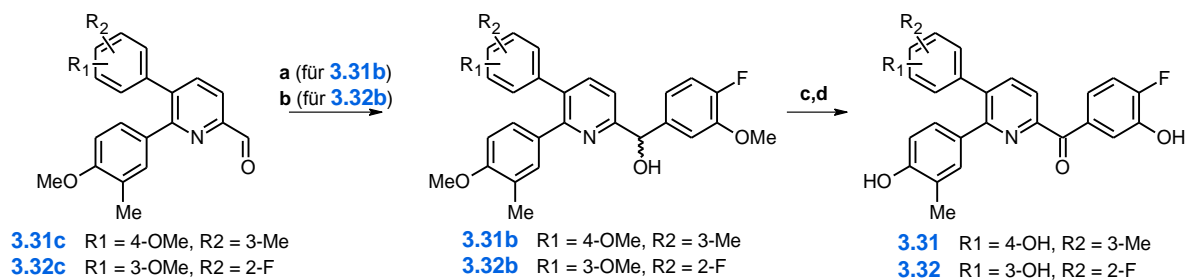
**Synthese der trisubstituierten Pyridine **3.31** und **3.32****

Die Synthese der trisubstituierten Pyridine **3.31** und **3.32** wurde ausgehend von Verbindung **3.9d** in sieben beziehungsweise acht Schritten ermöglicht (**Schema 8** und **9**). Die Schützung der Aldehydfunktion von Verbindung **3.9d** mit Trimethylorthoformiat und die folgende selektive Iodierung in 5-Position<sup>16</sup> lieferte das 5-Iod-6-bromderivat **3.31e** in moderater Ausbeute. Die SUZUKI-MIYAUURA-Reaktion mit 2.4 Äquivalenten 4-Methoxy-3-methylphenylboronsäure ergab das 5,6-bisubstituierte Pyridin **3.31d** in quantitativer Ausbeute, während die Reaktion mit 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure unter identischen Bedingungen regioselektiv in der monosubstituierten Verbindung **3.32e** resultierte, die in 6-Position weiterhin bromiert war. Die Umsetzung von **3.32e** mit 1.2 Äquivalenten 4-Methoxy-3-methylphenylboronsäure ergab jedoch in einer nachfolgenden SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung das asymmetrische Pyridin **3.32d**. Beide Verbindungen, **3.31d** und **3.32d** wurden mit Essigsäure entschützt, um die Aldehyd-Vorstufen **3.31c** und **3.32c** zu bilden (**Schema 8**).

**Schema 8:** Synthese der disubstituierten Pyridincarbaldehyde **3.31c** und **3.32c**.


Bedingungen: **a)** HC(OMe)<sub>3</sub>, *p*-TsOH, MeOH<sub>abs.</sub>, 65 °C, 4 h; **b)** LDA, THF<sub>abs.</sub>, -80 °C, 3 h, I<sub>2</sub>, THF<sub>abs.</sub>, -80 °C → RT; **c)** Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, R<sub>Ar</sub>B(OH)<sub>2</sub>, DME/H<sub>2</sub>O (2:1), 80 °C, über Nacht; **d)** Eisessig/H<sub>2</sub>O (2:3), 100 °C, 2 h.

Für **3.31** lieferte die nukleophile Addition von **3.31c** mit dem *in situ* gebildeten GRIGNARD-Reagenz von Verbindung **3.23e** den Alkohol **3.31b**, während für Verbindung **3.32** der entsprechende Alkohol nach vorheriger Lithiierung des Arylbromids **3.23e** und anschließender nukleophilen Addition mit **3.32c** erhalten werden konnte. Die Oxidation mit IBX und die folgende Etherspaltung mit BBr<sub>3</sub> resultierte in den Verbindungen **3.31** und **3.32** (Schema 9).

**Schema 9:** Synthese der trisubstituierten Pyridine **3.31** und **3.32**.


Bedingungen: **a)** **3.23e**, Mg, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, 2 h, 80 °C, 5 h; **b)** **3.23e**, *n*-BuLi, THF<sub>abs.</sub>, -80 °C → RT, 1 h; **c)** IBX, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, 3-4 h; **d)** BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C → RT, über Nacht.

## 3.4 Biologische Ergebnisse

### 3.4.1 Fluoreszenzbasierter Assay zur Bestimmung der 17 $\beta$ -HSD14 Inhibition

Ein fluoreszenzbasierter Assay wurde verwendet um die inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen zu beurteilen, indem die Zunahme der Fluoreszenz des während der katalytischen Reaktion gebildeten NADHs bestimmt wurde. Im Assay wurden das humane, rekombinant exprimierte und gereinigte 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, E2 als Substrat, NAD<sup>+</sup> als Cofaktor und die Inhibitoren verwendet (siehe **Abschnitt 3.10.2**). Aufgrund der geringen Sensitivität des Tests waren eine hohe Enzymkonzentration (zwischen 3.0  $\mu$ M und 3.5  $\mu$ M) und eine hohe Substratkonzentration (32  $\mu$ M) von Nöten. Die Resultate sind als prozentuale Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 2  $\mu$ M angegeben. Die Inhibitionskonstante  $K_i$  wurde experimentell bei Konzentrationen zwischen 2.6  $\mu$ M und 100  $\mu$ M bzw. 260 nM und 10  $\mu$ M, basierend auf der Potenz der getesteten Inhibitoren bestimmt. Durch die Verwendung einer ähnlichen Inhibitor- und Proteinkonzentration folgte die Analyse nicht der klassischen Kinetik.<sup>17,18</sup> Die Auswertung gelang daher mit Hilfe der quadratischen Gleichung nach MORRISON für „tight binding inhibitors“.<sup>19</sup> Bei unzureichend löslichen Inhibitoren konnte kein  $K_i$  bestimmt werden und die Aktivität wurde als prozentuale Inhibition, bei der höchsten Konzentration bei der der Inhibitor löslich war, angegeben. Verbindungen mit einer Inhibition von weniger als 10% bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M wurden als inaktiv bewertet. Die Assayergebnisse sind in den **Tabellen 3.3-3.7** aufgeführt.

### Aggregation

Es wurde durch Dr. SANDRINE MARCHAIS-OBERWINKLER sichergestellt, dass die getesteten Verbindungen nicht aggregierten oder zu einer Aggregation des Proteins führen, indem die Inhibitoren im Enzymassay sowohl mit und ohne Zugabe eines Detergens (0.5% v/v Tween 20) getestet wurden. Dabei konnten bei verschiedenen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen der inhibitorischen Aktivität beobachtet werden.

### 3.4.2 17 $\beta$ -HSD14 Inhibition

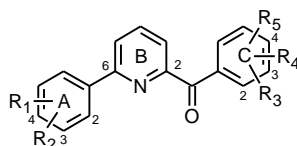
#### Variation der Substituenten am C-Ring

Nach der in **Abschnitt 3.2** beschriebenen vorangegangenen Studie konnte beobachtet werden, dass die Addition eines Fluoratoms in *ortho*-Position zur Hydroxygruppe am C-Ring (Vergleich von **3.1** und **3.2**) zu einer deutlichen Erhöhung der inhibitorischen Aktivität führt. Die analog fluoridierte 2,6-substituierte Verbindung **3.6** ( $K_i$  = 245 nM) wurde daraufhin synthetisiert und bestätigte diese Beobachtung, indem sie eine zehnfach höhere Potenz als die Referenzverbindung **3.4** ( $K_i$  = 26 nM) aufweist. Weiterhin kann diese Verbesserung der Affinität durch den 4-F Substituenten am C-Ring für

Verbindung **3.5** mit einem abweichenden Substitutionsmuster am A-Ring (3-F/4-OH) beobachtet werden ( $K_i = 467$  nM für **3.5** vs. 36 nM für **3.7**, **Tabelle 3.3**).

Der Einfluss des Substitutionsmusters am C-Ring wurde im Folgenden genauer untersucht, wobei für den A-Ring ein 2-F/3-OH Phenylmotiv gewählt wurde (Verbindungen **3.8-3.14**, **Tabelle 3.3**). Die Addition einer 2-OH Gruppe oder eines 2-F Atoms zum 3-OH/4-F Motiv am C-Ring resultiert in den äquipotenten Verbindungen **3.8**, **3.9** und **3.10** ( $K_i = 13$  nM, 11 nM und 9 nM). Der Austausch des 3-OH/4-F Motivs am C-Ring (**3.8**) gegen das 2-OH/3-OH Motiv (**3.11**:  $K_i = 64$  nM) und die 2-OH Substitution (**3.12**:  $K_i = 135$  nM) resultiert in einem stufenweisen Verlust an Affinität, während die Addition einer 4-OH Gruppe (**3.13**:  $K_i = 405$  nM) oder einer 6-OH Gruppe (**3.14**:  $K_i = 796$  nM) zum 3-OH/4-F Motiv am C-Ring zu einer weitaus größeren Abnahme der inhibitorischen Aktivität führt. Die Anwesenheit einer 3-OMe Gruppe am C-Ring (**3.15a**: inaktiv bei 100  $\mu$ M) kann nach Vergleich mit dem 3-OH Analogon **3.15** ( $K_i = 63$  nM) als unzutraglich für die Aktivität erachtet werden.

**Tabelle 3.3:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von 2,6-Pyridinketonderivaten mit unterschiedlichen Substituenten am C-Ring.



**3.4-3.15**

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>
<b>3.4</b>	3-Me	4-OH	H	3-OH	H	34	245 $\pm$ 21
<b>3.5</b>	3-F	4-OH	H	3-OH	H	16	467 $\pm$ 91
<b>3.6</b>	3-Me	4-OH	H	3-OH	4-F	60	26 $\pm$ 3
<b>3.7</b>	3-F	4-OH	H	3-OH	4-F	67	36 $\pm$ 5
<b>3.8</b>	2-F	3-OH	H	3-OH	4-F	72	13 $\pm$ 5
<b>3.9</b>	2-F	3-OH	2-OH	3-OH	4-F	76	11 $\pm$ 3
<b>3.10</b>	2-F	3-OH	2-F	3-OH	4-F	72	9 $\pm$ 3
<b>3.11</b>	2-F	3-OH	2-OH	3-OH	H	65	64 $\pm$ 4
<b>3.12</b>	2-F	3-OH	2-OH	H	H	66	135 $\pm$ 2
<b>3.13</b>	2-F	3-OH	2-OH	3-OH	4-OH	25	405 $\pm$ 177
<b>3.14</b>	2-F	3-OH	2-OH	3-OH	6-OH	11	796 $\pm$ 122
<b>3.15a</b>	H	H	H	3-OMe	4-F	k.i.	n.b.
<b>3.15</b>	H	H	H	3-OH	4-F	57	63 $\pm$ 3

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen; k.i.: keine Inhibition (<10% Inhibition bei 100  $\mu$ M), n.b.: nicht bestimmt.

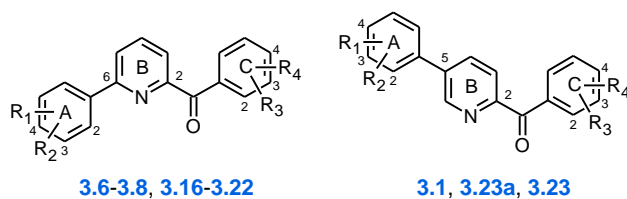
### Variation der Substituenten am A-Ring

2,6-Pyridinketone mit einem 3-OH/4-F oder 2-OH/3-OH Motiv wurden synthetisiert, wobei verschiedenen Substituenten am Phenyl A-Ring eingefügt wurden (**Tabelle 3.4**). Anhand von Verbindungen mit einem Substituenten in 3- oder 4-Position (**3.16**: 3-NMe<sub>2</sub>,  $K_i = 7$  nM; **3.17**: 3-OH,  $K_i = 7$  nM; **3.18**: 3-OH,  $K_i = 44$  nM und **3.19**: 4-F,  $K_i = 221$  nM) kann beobachtet werden, dass polare Gruppen in 3-Position (**3.16**, **3.17**, **3.18**) zu einer stärkeren Inhibition führen als eine lipophile Gruppe in 4-Position (**3.19**). Dieser Effekt kann für den A-Ring ebenfalls für die disubstituierte Verbindung **3.20** ( $K_i = 190$  nM) beobachtet werden, die ein lipophiles 3-Cl/4-F Substitutionsmuster aufweist. Dieses resultiert in einer vergleichbaren Affinität wie dies bereits für Verbindung **3.19** beschrieben wurde, die jedoch schlechter als für das unsubstituierte Phenyl **3.15** ( $K_i = 63$  nM) ist.

Verbindungen mit zwei Substituenten in 2/3- oder in 3/4-Position am A-Ring (**3.6**: 3-Me/4-OH,  $K_i = 26$  nM; **3.7**: 3-F/4-OH,  $K_i = 36$  nM; **3.8**: 2-F/3-OH,  $K_i = 13$  nM; **3.21**: 3-OH/4-OH,  $K_i = 7$  nM; **3.22**: 3-OH/4-Me,  $K_i = 47$  nM) weisen ähnliche Inhibitionskonstanten auf. Kein signifikanter Unterschied in der Aktivität kann zwischen am A-Ring mono- und disubstituierten Verbindungen beobachtet werden, solange eine 3-OH oder eine 4-OH Gruppe enthalten ist. Zusammenfassend werden die besten Affinitäten in Anwesenheit einer 3-OH oder einer 3-NMe<sub>2</sub> Gruppe erzielt (**Tabelle 3.4**).

Der ebenfalls synthetisierte Vertreter **3.23** ( $K_i = 17$  nM) der 2,5-Pyridinketonklasse mit einem 3-F/4-OH Substitutionsmuster am A-Ring zeigt eine vergleichbare Affinität wie Verbindung **3.1** (3-Me/4-OH,  $K_i = 24$  nM) und fällt somit in den Bereich der meisten 2,6-substituierten Verbindungen. Weiterhin ist auch in diesem Fall das Methoxyderivat **3.23a** (57% Inhibition bei 22  $\mu$ M) weniger aktiv im Vergleich zu dem Hydroxyanalogon **3.23** wie zuvor für Verbindung **3.15a** beschrieben wurde (**Tabelle 3.4**).



**Tabelle 3.4:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von 2,6-Pyridinketonderivaten mit unterschiedlichen Substituenten am A-Ring.


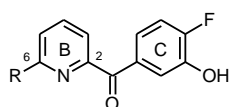
Verb.	Position A-ring	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>
<b>3.1</b>	5	3-Me	4-OH	3-OH	4-F	60	24 $\pm$ 9
<b>3.6</b>	6	3-Me	4-OH	3-OH	4-F	60	26 $\pm$ 3
<b>3.7</b>	6	3-F	4-OH	3-OH	4-F	67	36 $\pm$ 5
<b>3.8</b>	6	2-F	3-OH	3-OH	4-F	72	13 $\pm$ 5
<b>3.16</b>	6	3-NMe <sub>2</sub>	H	3-OH	4-F	57	7 $\pm$ 1
<b>3.17</b>	6	3-OH	H	3-OH	4-F	65	7 $\pm$ 2
<b>3.18</b>	6	3-OH	H	2-OH	3-OH	51	44 $\pm$ 3
<b>3.19</b>	6	H	4-F	3-OH	4-F	37	221 $\pm$ 46
<b>3.20</b>	6	3-Cl	4-F	3-OH	4-F	44	190 $\pm$ 45
<b>3.21</b>	6	3-OH	4-OH	3-OH	4-F	69	7 $\pm$ 1
<b>3.22</b>	6	3-OH	4-Me	3-OH	4-F	64	47 $\pm$ 7
<b>3.23a</b>	5	3-F	4-OMe	3-OMe	4-F	12	57% $\pm$ 6 <sup>b</sup>
<b>3.23</b>	5	3-F	4-OH	3-OH	4-F	61	17 $\pm$ 5

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen; <sup>b</sup> % Inhibition bei 22  $\mu$ M.

## Variation des A-Rings

Um die Rolle des Phenyl A-Rings zu untersuchen, wurde die um den A-Ring ärmere Verbindung **3.24** synthetisiert und es wurden Derivate dargestellt, die in 6-Position des Pyridin B-Rings mit verschiedenen Heterozyklen funktionalisiert sind (**3.25-3.28**, **Tabelle 3.5**). Der Vergleich von Verbindung **3.24** ( $K_i = 1540$  nM) mit **3.15** ( $K_i = 63$  nM) veranschaulicht einen deutlichen Verlust an Aktivität durch die Eliminierung des Phenylrings, der jedoch als bioisosteren Ersatz durch einen Thiophenring als Substituenten ausgeglichen werden kann (**3.25**,  $K_i = 97$  nM). Das nichtaromatische Piperidin **3.26** ( $K_i = 407$  nM) kann als wenig schlechterer Binder identifiziert werden, während das 4-Methylpiperazin **3.27** ( $K_i = 190$  nM) bereits eine ähnliche inhibitorische Aktivität im Vergleich zu Verbindung **3.15** aufweist. Anhand der etherverbrückten Verbindung **3.28** ( $K_i = 50$  nM) kann weiterhin gezeigt werden, dass die Position des aromatischen Substituenten variabel ist.

**Tabelle 3.5:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von 2,6-Pyridinketonderivaten mit unterschiedlichen Substituenten in 6-Position des B-Rings.



**3.15, 3.24-3.28**

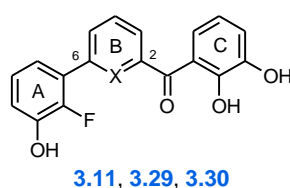
Verb.	R	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>
<b>3.15</b>	phenyl	57	63 $\pm$ 3
<b>3.24</b>	H	13	1540 $\pm$ 150
<b>3.25</b>	thiophen-3-yl	50	97 $\pm$ 28
<b>3.26</b>	piperidin-1-yl	43	407 $\pm$ 16
<b>3.27</b>	4-methylpiperazin-1-yl	31	190 $\pm$ 21
<b>3.28</b>	-O-phenyl	55	50 $\pm$ 0

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen.

## Variation des B-Rings

In **Abschnitt 3.2** wurde beschrieben, dass in der Klasse der 2,5-Pyridinketone der zentrale B-Ring eine wichtige Rolle im Hinblick auf die inhibitorische Wirkung besitzt. Dieser Aspekt wurde ebenfalls in der 2,6-substituierten Klasse untersucht, indem das Phenylanalogon **3.29** ( $K_i = 21$  nM) und das entsprechende *N*-Oxid **3.30** ( $K_i = 132$  nM) der Referenz **3.11** ( $K_i = 64$  nM) synthetisiert wurden (**Tabelle 3.6**). Der Vergleich der biologischen Daten zeigt, dass diese zusätzlichen Verbindungen lediglich geringe Unterschiede zur Verbindung **3.11** aufzeigen.

**Tabelle 3.6:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von Verbindungen mit verschiedenen B-Ringen.



Verb.	X	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>
<b>3.11</b>	N	77	64 $\pm$ 4
<b>3.29</b>	CH	60	21 $\pm$ 2
<b>3.30</b>	N <sup>+</sup> -O <sup>-</sup>	47	132 $\pm$ 13

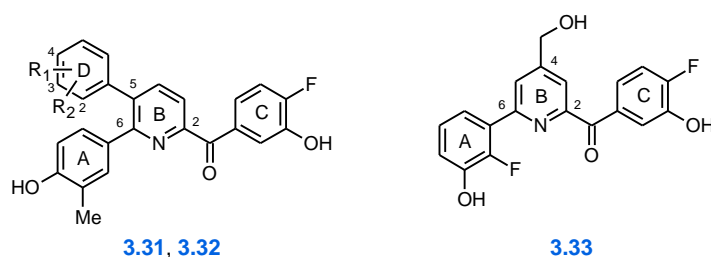
<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen.

## Trisubstituierte Verbindungen

Im Folgenden wurden basierend auf der Hypothese, dass der C-Ring und die Carbonylgruppe bei den 2,5- und den 2,6-substituierten Pyridinen, als Konsequenz einer Bindung an der gleichen Stelle im Protein, die gleichen Interaktionen eingehen, weitere Untersuchungen durchgeführt. Die Ähnlichkeiten der Affinitäten des 2,5-Derivates **3.23** ( $K_i = 17$  nM) und des 2,6-Derivates **3.7** ( $K_i = 36$  nM, **Tabelle 3.3**) suggerieren nach den genannten Vermutungen, dass der verfügbare Raum in der aktiven Tasche groß genug sein muss, um den A-Ring in 5- oder in 6-Position tolerieren zu können. Daher wurden trisubstituierte Pyridine synthetisiert, die Substituenten in den Positionen 5 und in 6 kombinieren (**3.31** und **3.32**, **Tabelle 3.7**). Diese Verbindungen erweisen sich als äquipotent (**3.31**,  $K_i = 9$  nM; **3.32**,  $K_i = 15$  nM) mit ähnlichen Affinitäten verglichen mit den disubstituierten Derivaten **3.6** und **3.23**.

Die Einführung einer Hydroxymethyl Gruppe in 4-Position des B-Rings führt hingegen zu einem leichten Verlust an Aktivität (**3.33**  $K_i = 86$  nM verglichen mit **3.8**  $K_i = 13$  nM, **Tabelle 3.7**).

**Tabelle 3.7:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von Pyridinderivaten mit zusätzlichem D-Ring oder Substituenten in 4-Position.



Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>
<b>3.6</b>	-	-	60	26 $\pm$ 3
<b>3.23</b>	-	-	61	17 $\pm$ 5
<b>3.31</b>	3-Me	4-OH	71	9 $\pm$ 4
<b>3.32</b>	2-F	3-OH	63	15 $\pm$ 4
<b>3.33</b>	-	-	47	86 $\pm$ 7

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen.

### 3.4.3 Pan Assay Interferenz Verbindungen (PAINS)<sup>20</sup>

Alle auf ihre inhibitorische Aktivität untersuchten Verbindungen wurden *in silico* mit Hilfe des „PAINS-remover“ Computerprogramms<sup>21</sup> auf unspezifische Bindung hin getestet. Von den analysierten Verbindungen wurden **3.9**, **3.11**, **3.13**, **3.18**, **3.22**, **3.29** und **3.30** als unspezifische Binder klassifiziert. Diese Verbindungen teilen ein 1,2-Dihydroxybenzolmotiv, deren potentiell toxische Wirkung literaturbekannt ist.<sup>22</sup> Dennoch sind die inhibitorischen Daten dieser Verbindungen präsentiert, da diese nützlich für das Aufstellen einer besser abgesicherten Struktur-Wirkungsbeziehung sind. Für den Fall, dass diese Verbindungen sehr interessant sein sollten, sind weitere Assays durchzuführen, die die Toxizität der Verbindungen überprüfen.

### 3.5 Bestimmung physikochemischer Parameter

Für alle synthetisierten Verbindungen wurde die molekulare Masse in einem Bereich zwischen 300 und 400 g/mol bestimmt. Eine Ausnahme stellen die trisubstituierten Verbindungen **3.31-3.33** mit einer leicht erhöhten molekularen Masse dar. Die  $\log P$  Werte für die Inhibitoren wurden *in silico* mittels Molinspiration<sup>23</sup> berechnet und ergaben Werte unter 5 bis auf Verbindungen **3.31-3.33**. Die *total polar surface area* (tPSA), die Anzahl der rotierenden Bindungen, sowie die Anzahl an H-Brücken Donoren und Akzeptoren erfüllen die „VEBER rules“ und „LIPINSKI'S rule of five“.<sup>6,7</sup> Unter Berücksichtigung der potentiellen Rolle von 17 $\beta$ -HSD14 im Gehirn, sollte die Möglichkeit der Inhibitoren die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden in Betracht gezogen werden. Die physikochemischen Eigenschaften für Verbindungen die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wurden von PAJOUHESH und LENZ<sup>24</sup> beschrieben. Die dort gelisteten Kriterien entsprechen für die meisten der synthetisierten Verbindungen, wobei die Verbindungen **3.16** und **3.28** besonders hervorzuheben sind. Der Löslichkeitsbereich der meisten Verbindungen wurde bestimmt, indem verschiedene Konzentrationen der analysierten Inhibitoren in 100 mM Phosphatpuffer (pH = 7.4) gemischt wurden und die eventuelle Bildung von Niederschlägen nach 0, 1, 2 und 24 h kontrolliert wurden. Die Berechnung der  $pK_a$  Werte der Hydroxygruppen am A- und C-Ring wurden *in silico* mittels Marvin Sketch durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Fluoratom in *ortho*-Position zu einer Hydroxygruppe den  $pK_a$  Wert um ca. eine Größenordnung senkt (z.B.  $pK_a$  OH/C-Ring: 7.8 für **3.7**, 8.8 für **3.5**). In **Tabelle 3.9 (Abschnitt 3.11)** sind die physikochemischen Parameter der synthetisierten Inhibitoren dargestellt.

## 3.6 Beschreibung der Kristallstrukturen

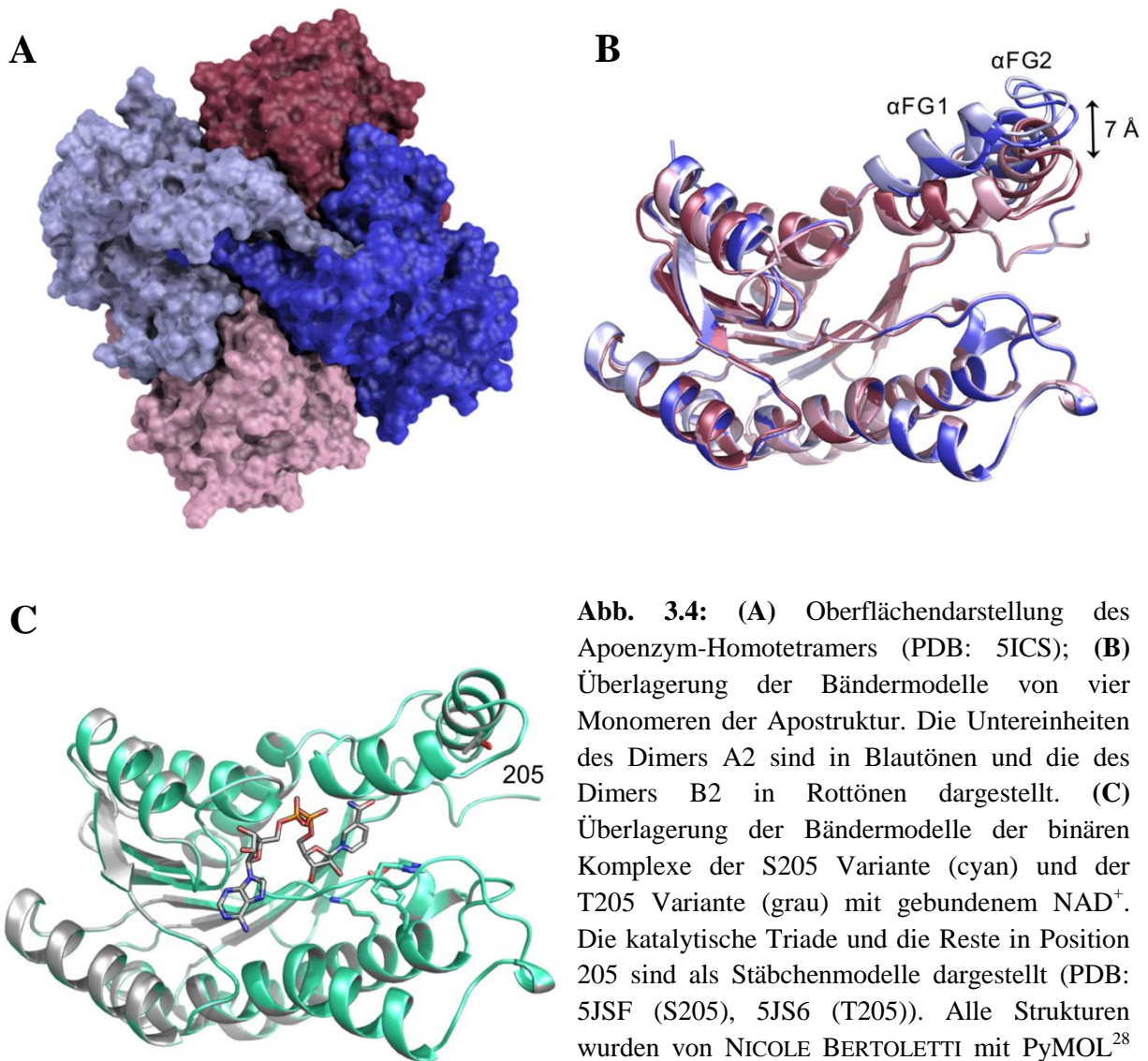
Wie in **Kapitel 1** beschrieben wurde, konnten LUKACIK *et al.* eine Apostruktur von 17 $\beta$ -HSD14 erhalten. Diese wies jedoch eine geringe Auflösung auf (2.4 Å). Das C-terminale Ende war teilweise in der Elektronendichte nicht zu beobachten. Ebenfalls beschrieben sie eine relativ weite Öffnung der Substratbindetasche des Enzyms,<sup>25</sup> wodurch die Frage nach der aktiven Konformation von 17 $\beta$ -HSD14 zu klären war. Daher wurde im Rahmen dieses Projekts der Erhalt einer Apostruktur mit einer besseren Auflösung, einer Kristallstruktur des Holoenzym und von Strukturen der Liganden in Komplexen mit dem Target angestrebt, die miteinander verglichen werden sollten. Im Zuge dessen konnten durch NICOLE BERTOLETTI (AG KLEBE, Philipps-Universität Marburg) zunächst Kristallstrukturen mit 17 $\beta$ -HSD14 als Apoenzym (Variante S205) und als binärer Komplex mit NAD<sup>+</sup> (Varianten S205 und T205) erhalten werden. Die Datenerfassung und -verarbeitung, sowie Details der Strukturverfeinerungen sind einer gemeinsamen Publikation zu entnehmen.<sup>26</sup> Die Inhibitoren mit der höchsten Bindungsaffinität zum Subtypen 14 wurden zur Bestimmung von Kristallstrukturen im Komplex mit dem Enzym ausgewählt, um einen Einblick in deren Bindungsmodi zu erhalten. Dabei konnten Strukturen von fünf verschiedenen Inhibitoren durch Co-Kristallisation des Proteins im Komplex mit dem Cofaktor NAD<sup>+</sup> und Liganden (**3.6**, PDB ID: 5L7T; **3.8**, PDB ID: 5L7Y; **3.9**, PDB ID: 5L7W; **3.11**, PDB ID: 5EN4; **3.21**, PDB ID: 5ICM) erhalten werden. Die experimentellen Daten dieser Experimente sind einer weiteren gemeinsamen Publikation zu entnehmen.<sup>27</sup>

### Beschreibung der Apostruktur und Holostrukturen

Eine Apostruktur mit einer Auflösung von 1.54 Å konnte erhalten werden. Sie liegt als Homotetramer vor (**Abb. 3.4A**) und besitzt eine A2B2-Symmetrie wie bereits von LUKACIK *et al.*<sup>25</sup> beschrieben. Jedoch kann in der hier vorgestellten Struktur der C-Terminus vollständig der Elektronendichte zugewiesen werden. Das Tetramer wird durch die Interaktion zweier identischer Dimere (A2 und B2) aufgebaut. Beide Dimere unterscheiden sich in der Konformation des *flexible loops*, das durch die  $\alpha$ -Helices  $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2 (Reste 189-212) gebildet wird. Das Enzym liegt für A2 (Blautöne, **Abb. 3.4A/B**) in einer offenen und für B2 (Rottöne, **Abb. 3.4A/B**) in einer geschlossenen Konformation vor. Eine Verschiebung des *flexible loops* um bis zu 7 Å kann dabei beobachtet werden, wodurch das Volumen der aktiven Tasche verändert wird (**Abb. 3.4B**). Im Dimer A2 reichen die C-terminalen Enden beider Monomere in die weit geöffnete Bindetasche des anderen Monomers.

Holostrukturen konnten für beide Varianten (S205 und T205) des Enzyms durch Co-Kristallisation mit NAD<sup>+</sup> erhalten werden. Hierbei wird das Tetramer durch vier identische Moleküle ausgebildet. Keine offensichtlichen strukturellen Unterschiede können anhand der 3D-Strukturen beider Holoenzyme der zwei Varianten ausgemacht werden. Beide Isoformen sind identisch, mit der mutierten Aminosäure in Position 205 als einzigem Unterschied (**Abb. 3.4C**). Das *flexible loop* ist in beiden Strukturen in einer

geschlossenen Konformation fixiert, das ähnlich wie zuvor beschrieben das Volumen der Bindetasche reduziert. Die aktive Tasche wird weiter durch die Präsenz von Tyr253' vom C-Terminus des benachbarten symmetrieäquivalenten Moleküls verkleinert. Das C-terminale Ende besitzt im Vergleich zum Dimer A2 der Apostruktur eine abweichende Konformation. Der Terminus reicht nicht in die Bindetasche des angrenzenden Monomers hinein, sondern ist auf der Oberfläche von diesem angeordnet. Des Weiteren können keine größeren konformativen Änderungen beobachtet werden.

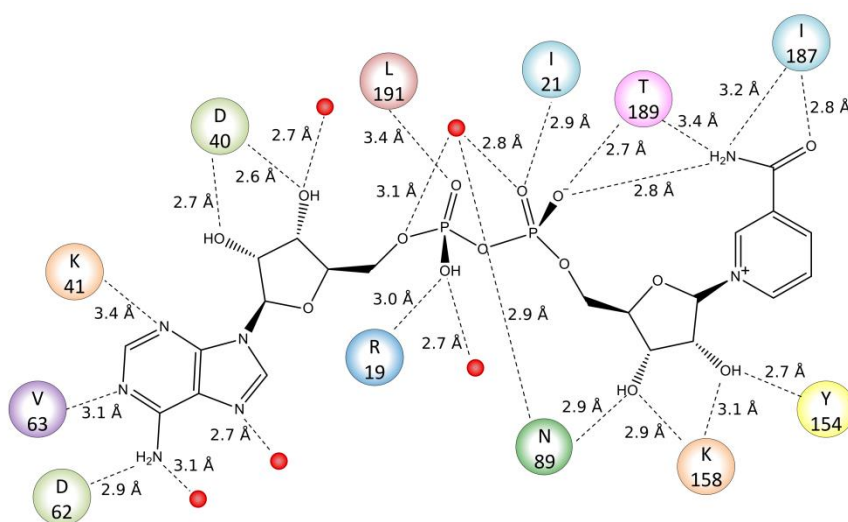


**Abb. 3.4:** (A) Oberflächendarstellung des Apoenzym-Homotetramers (PDB: 5ICS); (B) Überlagerung der Bändermodelle von vier Monomeren der Apostruktur. Die Untereinheiten des Dimers A2 sind in Blautönen und die des Dimers B2 in Rottönen dargestellt. (C) Überlagerung der Bändermodelle der binären Komplexe der S205 Variante (cyan) und der T205 Variante (grau) mit gebundenem NAD<sup>+</sup>. Die katalytische Triade und die Reste in Position 205 sind als Stäbchenmodelle dargestellt (PDB: 5JSF (S205), 5JS6 (T205)). Alle Strukturen wurden von NICOLE BERTOLETTI mit PyMOL<sup>28</sup> graphisch dargestellt.



### Beschreibung der Interaktionen des Cofaktors mit 17 $\beta$ -HSD14

Interaktionen, die den Cofaktor in seiner Bindetasche in 17 $\beta$ -HSD14 stabilisieren, konnten zum ersten Mal identifiziert werden. Der Cofaktor bindet in der Region der ROSSMANN-Faltung und steht durch H-Brückenbindungen in Kontakt zu zahlreichen Aminosäuren und zu einer Anzahl von kristallographisch beobachteten Wassermolekülen (**Abb. 3.5**). Diese Interaktionen sind ähnlich zu denen, die bereits für andere 17 $\beta$ -HSDs berichtet wurden, wie für 17 $\beta$ -HSD10.<sup>29</sup> Diese Wechselwirkungen sind sowohl für den binären, als auch für die ternären Komplexe konserviert, die im Folgenden beschrieben werden.

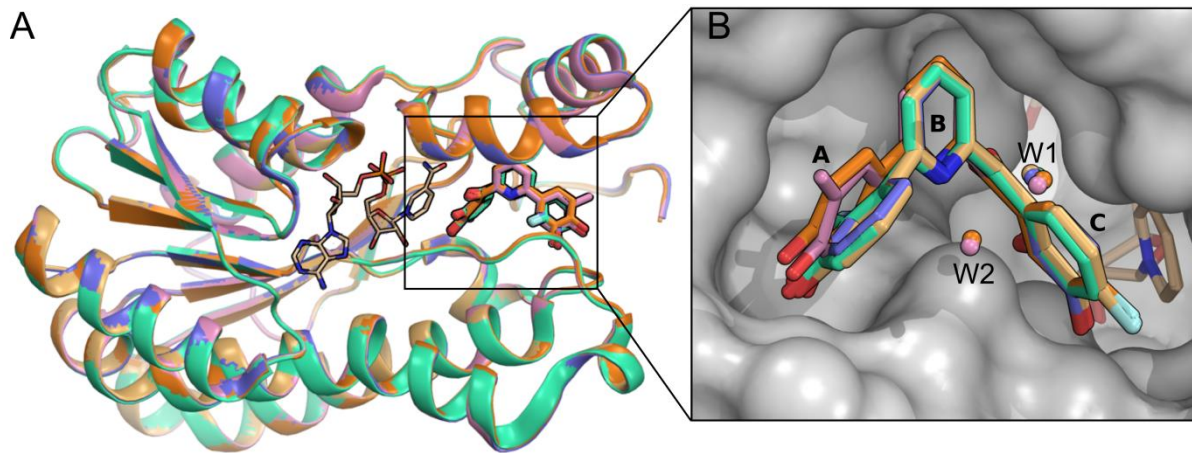


**Abb. 3.5:** Interaktionsschema zwischen NAD<sup>+</sup> und 17 $\beta$ -HSD14 (PDB: 5ICM). Wassermoleküle sind als rote Sphären und H-Brücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

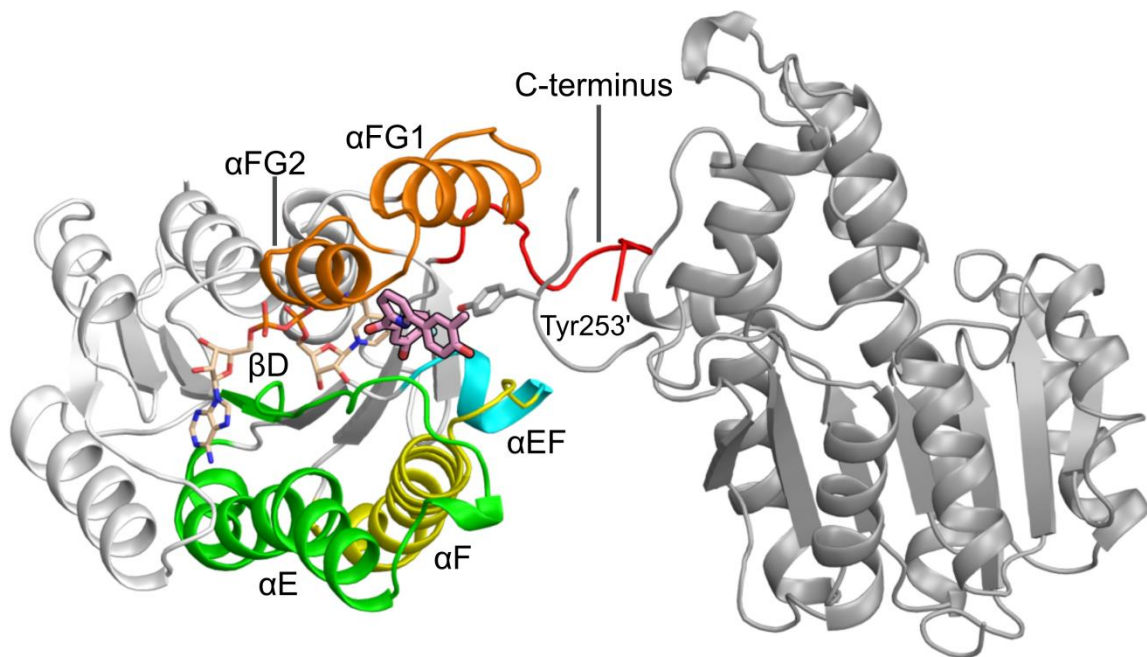
### Beschreibung der Inhibitorbindetasche

Die Überlagerung aller fünf ternären Komplexe offenbart keine Konformationsänderungen nach der Bindung der unterschiedlichen Liganden in die aktive Tasche des Proteins (**Abb. 3.6**). Die Inhibitoren binden in die Substratbindetasche, die durch zwei  $\alpha$ -Helices des *flexible loops* ( $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2, Aminosäuren 189-212, in orange), ein Teil der  $\alpha$ F Helix um die Aminosäuren Tyr154 und Lys158 der katalytischen Triade (in gelb), die kurze  $\alpha$ EF Helix (Aminosäuren 142-146, in cyan), das  $\alpha$ E- $\beta$ D verbindende Segment von Asn89 bis Arg98 (in grün) und durch das C-terminalen Ende (in rot, **Abb. 3.7**) ausgebildet wird. Die Bezeichnungen der verschiedenen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter erfolgte nach der von LUKACIK *et al.*<sup>25</sup> beschriebenen Nomenklatur. Weiterhin weist Tyr253' vom benachbarten Monomer (in grau auf der rechten Seite, **Abb. 3.7**) in Richtung der Inhibitorbindetasche und reduziert somit das Volumen der aktiven Tasche.



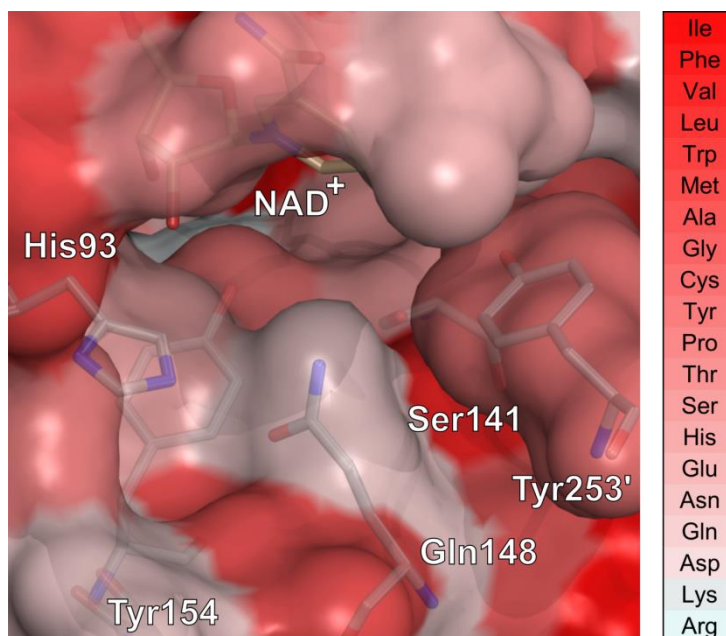


**Abb. 3.6:** Überlagerung der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in ternären Komplexen mit den fünf Inhibitoren **3.6**, **3.8**, **3.9**, **3.11** und **3.21**. (A) Das Enzym ist als Bändermodell und die Inhibitoren als Stäbchenmodell dargestellt (5L7T in rosa, 5L7Y in blau-violett, 5L7W in ocker, 5EN4 in grün und 5ICM in orange). Der Cofaktor ist mit schmalen Bindungen veranschaulicht. (B) Nahaufnahme der Bindetasche. Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) dargestellt. Die Kohlenstoffatome der Inhibitoren sind für **3.6** in rosa, **3.8** in blau-violett, **3.9** in ocker, **3.11** in grün und **3.21** in orange dargestellt. Die Inhibitoren sind als Stäbchenmodelle, und der Cofaktor mit schmalen Bindungen abgebildet. Die Wassermoleküle W1 und W2 sind in den gleichen Farben der entsprechenden Inhibitoren der jeweiligen Strukturen wiedergegeben.



**Abb. 3.7:** Bändermodell von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit Inhibitor **3.6** und Cofaktor NAD<sup>+</sup>. Die Inhibitorbindetasche wird durch die  $\alpha$ -Helices  $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2 (orange),  $\alpha$ F (mit den katalytischen Tyr154 und Lys158, gelb),  $\alpha$ EF (cyan),  $\alpha$ E und das  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ D (grün) und das C-terminale Ende (rot) begrenzt. Der Inhibitor **3.6** ist als Stäbchenmodell mit den Kohlenstoffatomen in rosa dargestellt. Das symmetrieäquivalente Molekül mit Tyr253' ist auf der rechten Seite in grau dargestellt. Der Cofaktor und Tyr253' sind mit schmalen Bindungen repräsentiert.

Generell ist die Inhibitorbindetasche vorwiegend hydrophob mit zwei hydrophilen Regionen: Die erste umfasst die zwei Aminosäuren Tyr154 und Ser141 der katalytischen Triade, und die zweite wird durch His93 und Gln148 ausgebildet (**Abb. 3.8**). Die zweite Region formt die Bindetasche in einer V-Form aus und könnte relevant in Bezug auf die Selektivität gegenüber anderen 17 $\beta$ -HSDs sein, die an dieser Stelle kein Histidin aufweisen.



**Abb. 3.8:** Oberflächendarstellung von 17 $\beta$ -HSD14: Farbcodierung entsprechend der Hydrophobizitätsskala nach EISENBERG (von dunkel rot für hydrophobe Aminosäuren bis weiß für hydrophile Aminosäuren).<sup>30</sup> Der Cofaktor NAD<sup>+</sup> und ausgewählte Aminosäuren sind als Stäbchenmodell dargestellt.

### Beschreibung der Bindungsmodi der Inhibitoren im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14

Ausgehend von der Oberflächendarstellung (**Abb. 3.6B**) ist es offensichtlich, dass die V-Form des Grundgerüsts der Inhibitoren sehr gut an die Geometrie der aktiven Tasche angepasst ist. Für alle fünf kristallisierten Inhibitoren können zusätzliche Wassermoleküle in der Bindetasche beobachtet werden. Wasser W1 kann für alle Inhibitoren an der gleichen Stelle gefunden werden. W1 ist zwischen dem B- und dem C-Ring mit einem ungefähren Abstand von 4 Å zum B-Ring lokalisiert. W1 bildet eine H-Brückenbindung mit der Seitenkette von Asn168 aus ( $d \approx 2.7\text{Å}$ ). Wasser W2 kann lediglich für Verbindungen **3.6** und **3.21** (**Abb. 3.6B**) beobachtet werden und befindet sich in Nachbarschaft des A-Rings. Zusätzlich kann W1 mit W2 über eine H-Brücke ( $d \approx 2.6\text{Å}$ ) interagieren. Für die restlichen Inhibitoren ist die Orientierung der Ebene des A-Rings verändert, was zur Verdrängung von W2 führt.

Aufgrund der starken Ähnlichkeiten sind im Folgenden ausschließlich die Interaktionen von Verbindungen **3.6** und **3.11** als Vertreter der Inhibitorserie mit dem Protein im Detail beschrieben. Die Strukturen und Details der Wechselwirkungen aller Verbindungen sind in **Abb. 3.9** veranschaulicht.

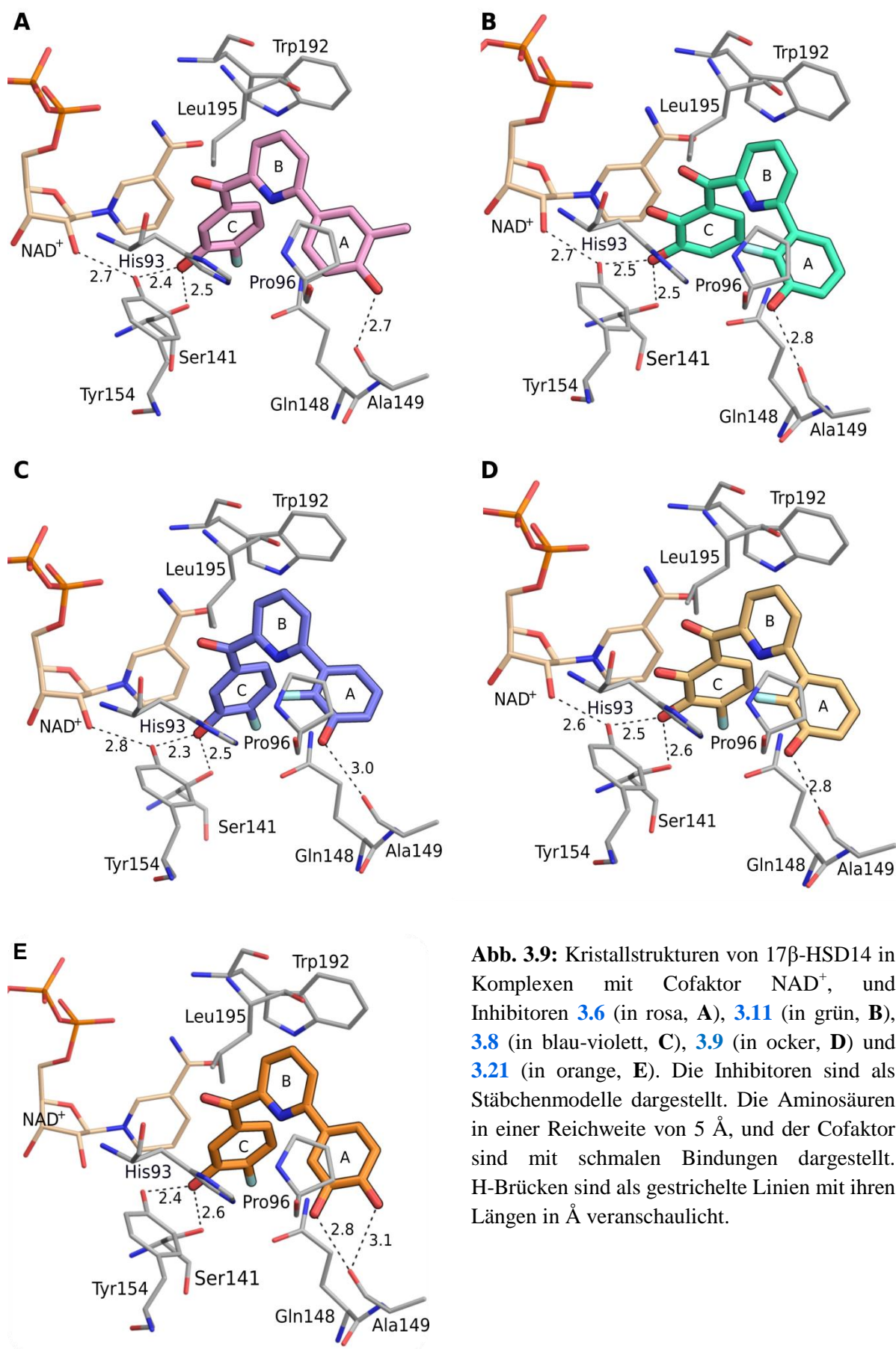
Die Inhibitoren **3.6** und **3.11** besitzen das gleiche Grundgerüst (2,6-Pyridinketon) und unterscheiden sich in der Natur ihrer Substituenten am A- und am C-Ring. Der C-Ring, die Ketogruppe und der Pyridinring beider Verbindungen binden an exakt der gleichen Position. Weiterhin ist der Winkel zwischen der Ketogruppe und dem Phenyl-C-Ring bei beiden Verbindungen identisch, unabhängig von der Anwesenheit der 2-OH Gruppe am C-Ring.

Die 3-OH Gruppe am C-Ring interagiert für **3.6** und **3.11** über auffallend kurze H-Brückenbindungen mit den Seitenketten von Tyr154 (**3.6**,  $d = 2.4 \text{ \AA}$ ; **3.11**,  $d = 2.5 \text{ \AA}$ ) und Ser141 (**3.6**,  $d = 2.5 \text{ \AA}$ ; **3.11**,  $d = 2.5 \text{ \AA}$ ) der katalytischen Triade. Das 4-F-Atom am C-Ring von Verbindung **3.6** ist in keine spezifische Interaktion involviert.

Der Phenyl-C-Ring von **3.6** und **3.11** ist durch VAN-DER-WAALS Kontakte mit der Nikotinamidstruktur des Cofaktors NAD<sup>+</sup> stabilisiert. Die Carbonylgruppe ist hingegen in keine direkte Interaktion mit dem Enzym involviert. Der zentrale Pyridinring (B-Ring) ist durch VAN-DER-WAALS Kontakte mit Trp192 und Leu195 verankert, die den oberen Teil des Pyridinrings umhüllen. Allerdings können keine engen Kontakte mit His93 beobachtet werden.

Im Fall von Inhibitor **3.6** wird eine H-Brückenbindung zwischen der 4-OH Gruppe am A-Ring mit der Carbonylgruppe des *backbones* von Ala149 ( $d = 2.7 \text{ \AA}$ ) ausgebildet. Die 3-Me Gruppe am A-Ring ist in keine Wechselwirkung involviert. Der aromatische A-Ring wird nicht durch  $\pi$ -stacking Interaktionen stabilisiert, aber dennoch werden VAN-DER-WAALS Kontakte mit Pro96 beobachtet. Keine durch Wassermoleküle vermittelten H-Brückenbindungen können ausgemacht werden, was den Verbleib von W1 in dem relativ lipophilen Umfeld bemerkenswert macht.

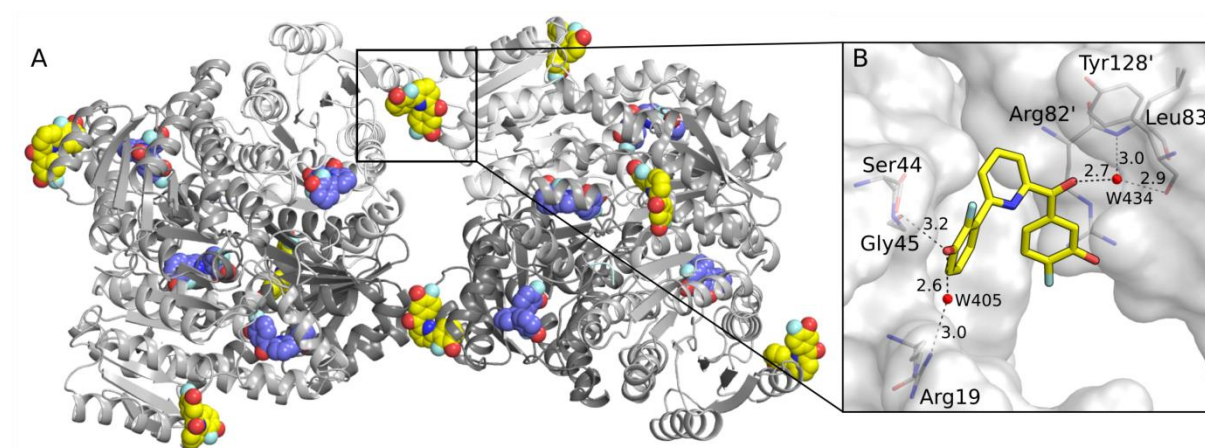
Für **3.11** kann eine Rotation des A-Rings beobachtet werden. Dennoch erlaubt die veränderte Orientierung der 3-OH Gruppe am C-Ring die Ausbildung einer H-Brückenbindung mit der Carbonylgruppe von Ala149 ( $d = 2.8 \text{ \AA}$ ), wie sie auch für **3.6** gezeigt wurde. Der aromatische A-Ring kann ebenfalls VAN-DER-WAALS Interaktionen mit Pro96 ausbilden.



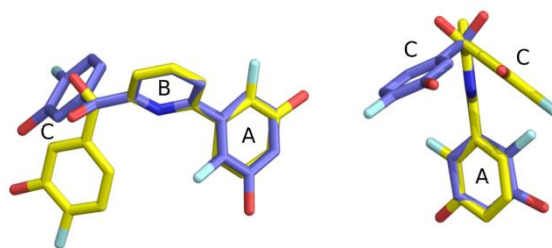
**Abb. 3.9:** Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit Cofaktor NAD<sup>+</sup>, und Inhibitoren **3.6** (in rosa, **A**), **3.11** (in grün, **B**), **3.8** (in blau-violett, **C**), **3.9** (in ocker, **D**) und **3.21** (in orange, **E**). Die Inhibitoren sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Die Aminosäuren in einer Reichweite von 5 Å, und der Cofaktor sind mit schmalen Bindungen dargestellt. H-Brücken sind als gestrichelte Linien mit ihren Längen in Å veranschaulicht.



Interessanterweise kann in der Kristallstruktur des ternären Komplexes von **3.8** mit 17 $\beta$ -HSD14 die Anwesenheit eines weiteren Inhibitormoleküls an der Schnittfläche zwischen zwei Tetrameren beobachtet werden (**Abb. 3.10A**). Die nähere Betrachtung dieser Bindestelle (**Abb. 3.10B**) zeigt auf, dass der Inhibitor durch H-Brückenbindungen zwischen der 3-OH Gruppe des A-Rings und der Hydroxygruppe von Ser44 ( $d = 3.2$  Å) als auch mit dem Wassermolekül W405 ( $d = 2.6$  Å), das mit Arg19 im Kontakt steht ( $d = 3.0$  Å), stabilisiert wird. Die Ketogruppe interagiert mit dem benachbarten Tetramer über Wassermolekül W434 ( $d = 2.7$  Å), welches mit dem *backbone* von Leu83' (NH,  $d = 3.0$  Å) und Tyr128' (CO,  $d = 2.9$  Å) verbunden ist. Generell bindet der Inhibitor in diesem „Kontaktflächen-Bindungsmodus“ in einer eher hydrophilen Umgebung. Dabei unterscheiden sich die Molekülgeometrien zwischen dem „Kontaktflächen-Liganden“ und dem in der aktiven Tasche bindenden Liganden. Die Diederwinkel und eine Überlagerung beider Bindungsmodi von **3.8** sind in **Abb. 3.11** beschrieben.



**Abb. 3.10:** (A) Gesamtübersicht der Kristallstruktur von zwei 17 $\beta$ -HSD14 Tetrameren im Komplex mit **3.8**. Die Proteinmonomere sind in grau als Bändermodell und die Inhibitoren sind als Kalottenmodelle dargestellt („Bindetachen-Liganden“: blau-violett; „Kontaktflächen-Liganden“: gelb). (B) Nahaufnahme der zweiten Ligandenbindetasche von **3.8** an der Kontaktfläche zwischen zwei Tetrameren. Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) dargestellt. Inhibitor **3.8** ist als Stäbchenmodell und relevante Aminosäuren sind als schmale Bindungen dargestellt. Aminosäuren des symmetrieäquivalenten Moleküls sind mit ' gekennzeichnet. H-Brücken sind als gestrichelte Linien mit ihren Längen in Å veranschaulicht.



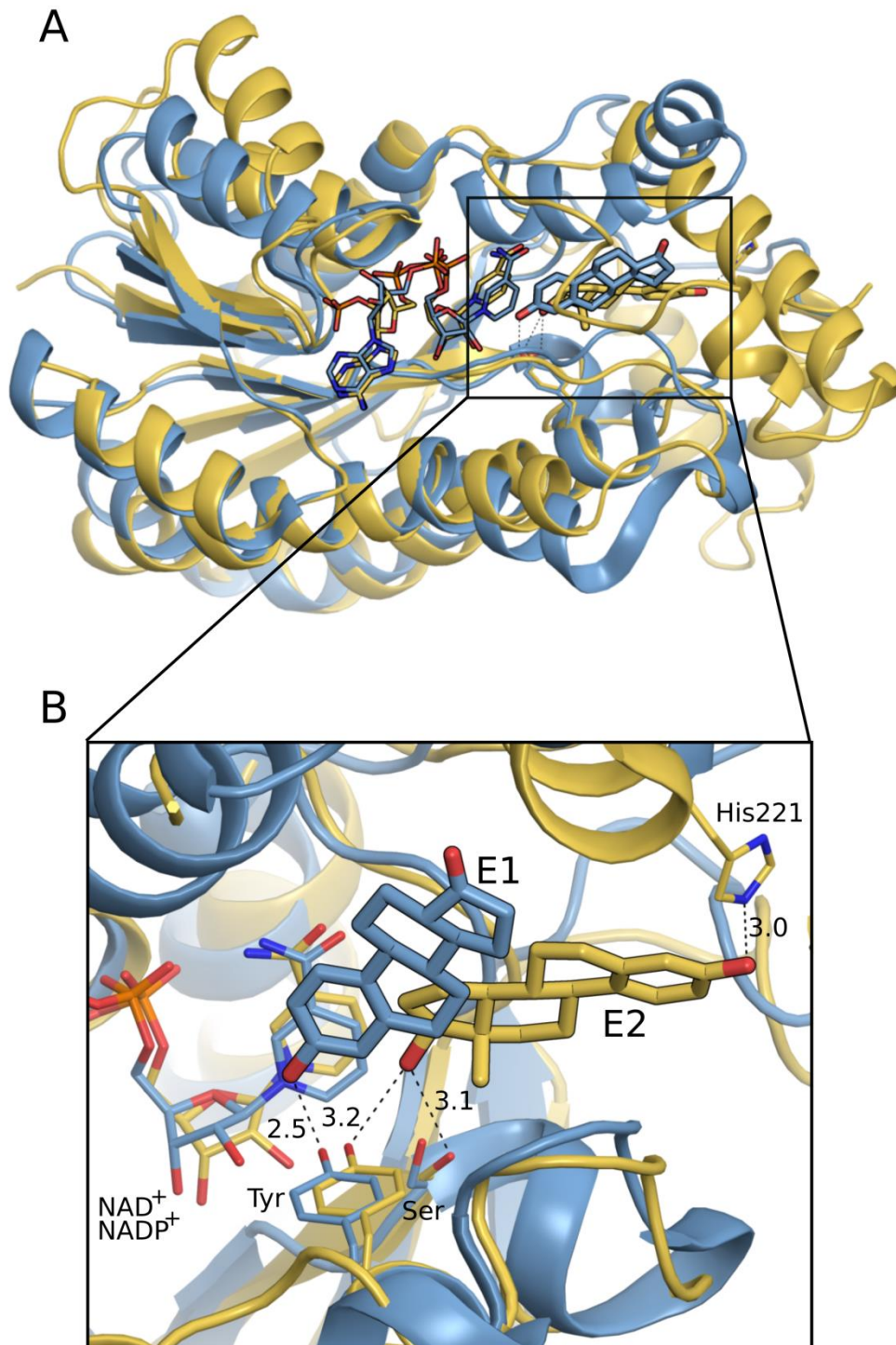
Winkel	Aktive Tasche	Kontaktfläche
Keton $\rightarrow$ C-Ring	-29°	4°
Keton $\rightarrow$ B-Ring	129°	-133°
C <sup>2</sup> /A-Ring $\rightarrow$ B-Ring	131°	-60°

**Abb. 3.11:** Überlagerung der Bindungsmodi von Verbindung 3.8 (B-Ring als Basis). Ligand an Kontaktfläche: gelb; Ligand in aktiver Tasche: blau-violett.

### Vergleich der Strukturen von 17 $\beta$ -HSD1, 17 $\beta$ -HSD2 und 17 $\beta$ -HSD14

Die existierende Kristallstruktur des ternären Komplexes von 17 $\beta$ -HSD1 mit dem Cofaktor NADP<sup>+</sup> und E2 (PDB ID: 1FDT) erlaubt einen direkten Vergleich mit der Struktur von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit dem Cofaktor NAD<sup>+</sup> und E1 (PDB ID: 5HS6). Die Überlagerung beider Strukturen offenbart eine Strukturserhaltung in nur einigen Regionen (22% Sequenzidentität berechnet von NICOLE BERTOLETTI mit COOT,<sup>31</sup> **Abb. 3.12**). Kleine Unterschiede können in der NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>-Bindetasche zwischen den Typen 1 und 14 beobachtet werden (RMSD von 1.6 Å, berechnet von NICOLE BERTOLETTI mit COOT, Ca Überlagerung). Dieses Resultat war zu erwarten, da beide Enzyme unterschiedliche Cofaktoren binden (NAD<sup>+</sup> für 17 $\beta$ -HSD14 und NADP<sup>+</sup> für 17 $\beta$ -HSD1). Das *flexible loop* begrenzt bei 17 $\beta$ -HSD1 das Ende der Bindetasche, während die entsprechende Schleife bei 17 $\beta$ -HSD14 nach oben verschoben ist und die Bindetasche geöffnet lässt. Dies resultiert in einer kleineren Bindetasche für den Typ 1. Während die katalytische Triade in beiden Enzymen konserviert vorliegt, binden die Steroidssubstrate in der aktiven Tasche in unterschiedlichen Orientierungen und gehen verschiedene Interaktionen mit dem Enzym ein.

Da bislang keine Kristallstruktur für 17 $\beta$ -HSD2 vorhanden ist, kann kein Vergleich der Strukturen der Typen 2 und 14 durchgeführt werden.



**Abb. 3.12:** (A) Überlagerung der ternären Komplexe von 17 $\beta$ -HSD1 (gelb, PDB ID: 1FDT) und 17 $\beta$ -HSD14 (hellblau, PDB ID: 5HS6). (B) Nahaufnahme der überlagerten Substratbindetaschen. Die Proteine sind als Bändermodell und die Steroide sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Die an der Bindung zum Steroid beteiligten Aminosäuren (Tyr154 für 17 $\beta$ -HSD14; Tyr155, Ser142 und His221 für 17 $\beta$ -HSD1), und die Cofaktoren sind mit schmalen Bindungen dargestellt. Die Kohlenstoffatome von E1 im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14 sind in hellblau und die Kohlenstoffatome von E2 im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD1 sind in gelb dargestellt. H-Brücken sind als gestrichelte Linien mit ihren Längen in Å veranschaulicht. Die 18-Me Gruppe von E1 konnte der Elektronendichte nicht eindeutig zugeordnet werden und ist nicht dargestellt.

### 3.7 Selektivität

Unter Berücksichtigung, dass die Ausgangsverbindung der hier vorgestellten 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren aus der Untersuchung von 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 Inhibitoren resultierten, war es von hoher Wichtigkeit das Selektivitätsprofil der dargestellten Verbindungen gegenüber den Subtypen 1 und 2 zu untersuchen.

Die inhibitorische Aktivität der interessantesten Verbindungen gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 wurde von MOHAMED SALAH und Dr. AHMED ABDELSAMIE (ElexoPharm GmbH, Saarbrücken) mithilfe eines Radioaktivitätsassays durchgeführt. Nach der Inkubation des Proteins, Cofaktor und Inhibitor wurde die Menge des während der katalysierten Reaktion gebildeten [ $^3$ H]-E2 (für Subtyp 1) beziehungsweise [ $^3$ H]-E1 (für Subtyp 2) quantifiziert.<sup>32</sup> Die Resultate sind in **Tabelle 3.8** als prozentuale Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M beschrieben.

Wie nach den bereits in **Abschnitt 3.2** beobachteten Ergebnissen zu erwarten war zeigt das 2,5-substituierte Pyridin **3.23** (47% Inhibition) im Vergleich zu den getesteten 2,6-substituierten Pyridinen **3.6**, **3.8**, **3.9**, **3.11** und **3.22** (9-23% Inhibition) die höchste Affinität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1, die alle näherungsweise inaktiv gegenüber diesem Subtypen sind.

Die Inhibition von 17 $\beta$ -HSD2 ist für die getesteten 2,6-substituierten Pyridine **3.6**, **3.8**, **3.9**, **3.11** und **3.22** etwas höher (30-62% Inhibition) als für 17 $\beta$ -HSD1 und viel höher für die 2,5-substituierten Pyridinketone **3.23** und **3.1** (64% und 85% Inhibition).

Ein direkter Vergleich der inhibitorischen Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 und 17 $\beta$ -HSD14 ist dennoch problematisch, da unterschiedliche Bedingungen für die Assays verwendet wurden. Dennoch kann nach der CHENG-PRUSOFF Gleichung<sup>33</sup> mit den für den 17 $\beta$ -HSD2 Assay verwendeten Bedingungen ein kalkulierter  $K_i$  ( $cK_i$ ) bestimmt werden. Für Verbindungen mit einem  $IC_{50}$  Wert von ca. 1  $\mu$ M (50% Inhibition bei 1  $\mu$ M) ist somit ein  $cK_i$  von ca. 450 nM zu erwarten (mit  $K_{m,17\beta-HSD2} = 400 \text{ nM}$ <sup>34</sup> und  $[S] = 500 \text{ nM}$ ). Mit 48% und 43% Inhibition gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 zeigen die Verbindungen **3.8** und **3.9** einen  $cK_i$  von  $\geq 450 \text{ nM}$ . Somit liefert der Vergleich der  $K_i$  Werte für 17 $\beta$ -HSD2 und 17 $\beta$ -HSD14 ein Selektivitätsfaktor (Verhältnis  $K_i(\text{HSD2})/K_i(\text{HSD14})$ ) von ca. 35 für **3.8** und von  $\geq 41$  für **3.9** bestimmt werden, wodurch diese relativ selektiv gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 sind. Das Selektivitätsprofil von **3.11** gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 (30% Inhibition) sollte entsprechend besser sein.

Als Steroidomimetika könnten die synthetisierten Verbindungen unerwünschte Bindungsaffinitäten gegenüber den Estrogenrezeptoren (ERs)  $\alpha$  und  $\beta$  aufweisen. WETZEL *et al.* beschrieben jedoch bereits, dass die in der vorgegangenen Studie beschriebenen Verbindungen **3.1-3.4** nur sehr geringe Affinitäten gegenüber beiden ER-Subtypen ( $< 0.1\%$ , E2 als 100%-Referenz) aufweisen.<sup>5</sup> Es ist daher anzunehmen, dass die synthetisierten Verbindungen, die das gleiche Strukturgerüst besitzen, keine starke Bindung zu den ERs zeigen.



**Tabelle 3.8:** Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 und inhibitorische Aktivität der interessantesten Inhibitoren gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2.

Verb.	17 $\beta$ -HSD14 $K_i$ (nM) <sup>a</sup>	17 $\beta$ -HSD1 (% Inh. bei 1 $\mu$ M) <sup>b</sup>	17 $\beta$ -HSD1 (% Inh. bei 1 $\mu$ M) <sup>c</sup>
<b>3.1</b>	24 $\pm$ 9	47	85
<b>3.4</b>	245 $\pm$ 21	6	85
<b>3.6</b>	26 $\pm$ 3	9	62
<b>3.8</b>	13 $\pm$ 5	23	43
<b>3.9</b>	11 $\pm$ 3	12	48
<b>3.11</b>	64 $\pm$ 4	13	30
<b>3.17</b>	7 $\pm$ 2	13	34
<b>3.22</b>	47 $\pm$ 7	14	37
<b>3.23</b>	17 $\pm$ 5	47	64

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen. <sup>b</sup> 17 $\beta$ -HSD1 Enzym (Plazenta), zytosolische Fraktion, radioaktiver Verdrängungsassay, Substrat [<sup>3</sup>H]-E1 + E1 [500 nM], NADH [0.5 mM], Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, Standardabweichung < 20%. <sup>c</sup> 17 $\beta$ -HSD2 Enzym (Plazenta), microsomale Fraktion, radioaktiver Verdrängungsassay, Substrat [<sup>3</sup>H]-E2 + E2 [500 nM], NAD<sup>+</sup> [1.5 mM], Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, Standardabweichung < 20%.

## 3.8 Diskussion der Ergebnisse

### 3.8.1 Vergleich der Apo- und Holostruktur und Strukturen der Inhibitoren als ternärer Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14

Die Struktur des binären Komplexes mit dem Cofaktor NAD<sup>+</sup> unterscheidet sich hinsichtlich des *flexible loops* ( $\alpha$ FG1- $\alpha$ FG2-Segment) vom Apoenzym. In der Anwesenheit von NAD<sup>+</sup> nimmt es eine „geschlossene“ Konformation an, während ohne Cofaktor eine „offene“ (A2 Dimer, **Abb. 3.4**) und eine „geschlossene“ Konformation (B2 Dimer, **Abb. 3.4**) gefunden werden kann. Die Gesamtstruktur und die Geometrie der aktiven Tasche der erhaltenen ternären Komplexe mit den Inhibitoren ähneln stark derer des binären Komplexes, in denen durch die „geschlossene“ Konformation der Schleife die längliche und konisch geformte aktive Tasche abgegrenzt wird. Es lässt sich somit andeuten, dass die Bindung des Cofaktors zu der Verschiebung des *flexible loops* führt und die aktive Konformation des Enzyms hervorbringt.

### 3.8.2 Struktur-Wirkungsbeziehung der vorgestellten Inhibitoren

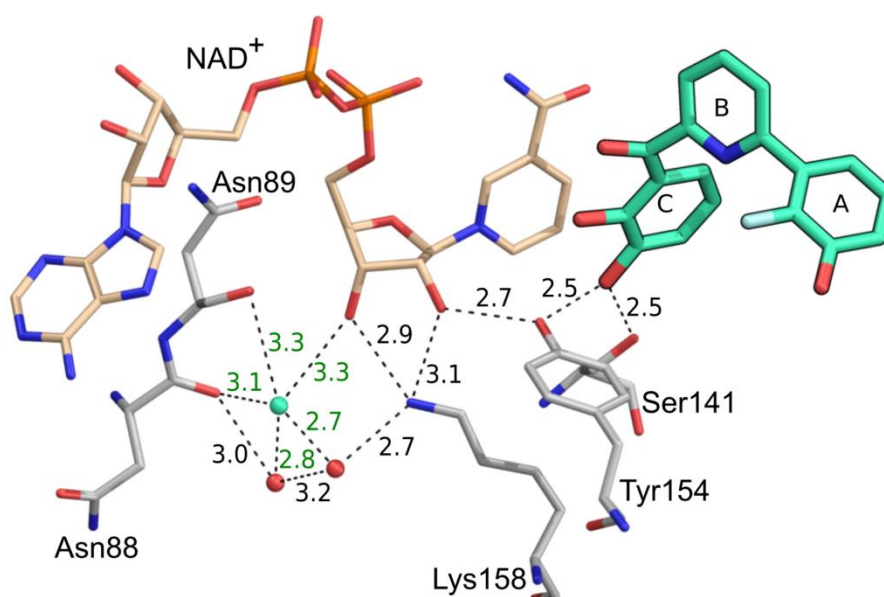
Die Kombination der biologischen Resultate in Verbindung mit den Kristallstrukturen der fünf Inhibitoren als ternärer Komplex mit dem Protein, und den physikochemischen Eigenschaften der Liganden diente als Grundlage zur Durchführung einer Struktur-Wirkungsbeziehung der vorgestellten 2,5- und 2,6-substituierten Pyridinketone.

#### Betrachtung des C-Ring Abschnitts

Die 3-OH Gruppe am C-Ring geht wichtige H-Brückenbindungen mit den Aminosäuren Tyr154 und Ser141 ein, die den Inhibitor in der aktiven Tasche stabilisieren. Die Azidität dieser Hydroxygruppe wird durch die Einführung eines Fluoratoms in *ortho*-Position verstärkt und korreliert mit einem Gewinn an Bindungsaffinität. Dementsprechend zeigen die beschriebenen Kristallstrukturen der fünf Inhibitoren, dass die zur Hydroxygruppe ausgebildeten H-Brücken relativ kurz sind ( $d = 2.3\text{-}2.5 \text{ \AA}$ ). Diese Resultate bestätigen die Hypothese von HWANG *et al.*,<sup>35</sup> dass bei SDR-Enzymen der  $pK_a$  Wert der Hydroxygruppe des katalytischen Tyrosins durch elektrostatische Interaktionen mit dem protonierten katalytischen Lys-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> und NAD<sup>+</sup> deutlich abgesenkt wird. Dieses Tyrosin liegt somit als deprotonierte Spezies in der aktiven Tasche vor. In den hier vorgestellten Strukturen kann das negativ geladene, oder zumindest stark polarisierte Tyr154 über H-Brücken mit der 3-OH Gruppe des C-Rings der Inhibitoren interagieren, was zu einem engen Kontakt zwischen den Liganden und dem Protein führt. Durch eine azidere Hydroxygruppe in 3-Position wird diese Interaktion aufgrund der stärker polarisierten OH-Bindung darüber hinaus stabilisiert.

Ferner kann anhand der Kristallstrukturen beobachtet werden, dass die Inhibitoren in ein komplexes H-Brückennetzwerk eingebunden sind, in dem sie über Tyr154 mit den Hydroxygruppen der Ribose des Cofaktors, Lys158, Asn88, Asn89 und mit zwei bis drei Wassermolekülen in Kontakt stehen (Abb. 3.13). Das hervorgehobene H-Brückennetzwerk verstärkt die Interaktion zwischen Tyr154 und der 3-OH Gruppe am C-Ring der Inhibitoren<sup>36</sup> und stabilisiert dadurch zusätzlich den Liganden im aktiven Zentrum.

Das H-Brücken Donor-Akzeptor-Profil für die Interaktion zwischen der 3-OH Gruppe am C-Ring und den Aminosäuren Tyr154 und Ser141 kann weiter interpretiert werden: Ein deprotoniertes Tyr154 legt nahe, dass die 3-OH Gruppe am C-Ring des Inhibitors mit Tyr154 als H-Brücken Donor und mit der Hydroxygruppe des Ser141 als H-Brücken Akzeptor fungiert. Für die Inhibitoren mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe in 2-Position des C-Rings, kann eine intramolekulare H-Brücke mit der Ketogruppe gebildet werden, wodurch keine zusätzliche Interaktion mit Tyr154 erwartet werden kann, das wie bereits beschrieben mit der Ribose und der 3-OH Gruppe des C-Rings in Kontakt steht. Zusätzlich ist anzumerken, dass die Versteifung durch die Ausbildung der intramolekularen H-Brücke zu keiner Erhöhung der Bindungsaffinität führt (Vergleich von 3.8 mit 3.9).



**Abb. 3.13:** H-Brückennetzwerk zur Stabilisierung des Inhibitors 3.11 in der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14. Verbindung 3.11 ist als Stäbchenmodell mit seinen Kohlenstoffatomen in grün dargestellt. Die am H-Brückennetzwerk beteiligten Aminosäuren und der Cofaktor NAD<sup>+</sup> (beige) sind durch dünne Bindungen veranschaulicht. H-Brücken sind als gestrichelte Linien mit ihren Längen in Å beschrieben. Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt. Die in allen Strukturen vorhandenen Wassermoleküle sind in rot veranschaulicht. Das zusätzlich erkennbare Wassermolekül (höhere Auflösung) in den Komplexen mit 3.11 und 3.21 ist in grün repräsentiert.

Der Austausch der 3-OH Gruppe am C-Ring mit einer 3-OMe Gruppe kann als nachteilig für die inhibitorische Aktivität beschrieben werden (**3.15a**: keine Inhibition bei 100  $\mu$ M vs. **3.15**:  $K_i = 63$  nM). Verbindung **3.15a** wurde in die Kristallstruktur von 17 $\beta$ -HSD14 modelliert (**Abb. 3.13A, Abschnitt 3.11**), was zu einer Verschiebung der Bindungspose des Liganden im Vergleich zu den beobachteten Inhibitoren in den Kristallstrukturen (**Abb. 3.9**) führte. Diese würde lediglich eine H-Brückeninteraktion zwischen dem Sauerstoff der 3-OMe und der Hydroxygruppe von Tyr154 ermöglichen, wenn die 3-OMe Gruppe als Akzeptor fungieren würde. Die Inaktivität dieser Verbindung unterstützt somit die Hypothese, dass ein H-Brücken Donor in 3-Position des C-Rings für die inhibitorische Aktivität des Liganden notwendig ist. Zusätzlich konnte mit der Anwesenheit der 3-OMe Gruppe keine Interaktion mit Ser141 beobachtet werden.

### Betrachtung des A-Ring Abschnitts

Basierend auf den biologischen Resultaten ist es offensichtlich, dass die Entfernung des A-Rings zu einem hohen Verlust an inhibitorischer Aktivität führt (**3.15**,  $K_i = 63$  nM vs. **3.24**  $K_i = 1541$  nM), was auf eine wichtige Interaktion vom A-Ring mit dem Protein hinweist. Die Kristallstrukturen zeigen, dass kein Aminosäurerest in Nachbarschaft des A-Rings  $\pi$ -stacking Interaktionen mit diesem ausbilden. Dies weist darauf hin, dass der aromatische A-Ring über hydrophobe Interaktionen, vor allem mit Pro96, stabilisiert werden muss.

Weiterhin wird beobachtet, dass die Einführung einer Hydroxygruppe in 3- oder 4-Position lediglich einen leichten Gewinn an Affinität im Vergleich zum unsubstituierten A-Ring mit sich bringt. Entweder interagieren diese Hydroxygruppen nur über schwache H-Brücken mit der *backbone* Carbonylgruppe von Ala149, oder der Nutzen einer starken Bindung wird durch einen hohen Beitrag zur Desolvationsenergie eingebüßt. Es ist ebenfalls auffällig, dass weder eine elektronenschiebende noch eine elektronenziehende Gruppe in Nachbarschaft zu den besagten Hydroxygruppen die Potenz der Inhibitoren beeinflussen.

Der signifikante Affinitätsgewinn durch die Dimethylamino-Verbindung **3.16** wurde mit Hilfe einer Modellstruktur (**Abb. 3.14B, Abschnitt 3.11**) untersucht. Dabei viel auf, dass die  $NMe_2$ -Gruppe in engem Kontakt mit der Carbonylgruppe von Ala149 steht. Eine starke Interaktion zwischen der  $NMe_2$ -Gruppe und dem Carbonylsauerstoff könnte nur möglich sein, wenn das tertiäre Amin protoniert wäre. Allerdings ist unter Betrachtung des  $pK_a$  Wertes der  $NMe_2$  Gruppe unwahrscheinlich, dass diese geladen vorliegt. Der Gewinn an Affinität könnte somit aus zusätzlichen hydrophoben Interaktionen mit Pro96 resultieren.

In der Kristallstruktur des Komplexes mit Verbindung **3.6** interagiert die 3-Me Gruppe des A-Rings weder mit dem Protein, noch mit dem Lösungsmittel. Stattdessen ist es in eine unbesetzte Tasche

gerichtet, während die 3-OH Gruppe von Verbindung **3.11** in die entgegengesetzte Richtung orientiert ist und mit Ala149 interagieren kann. Die geänderte Orientierung der 3-Me Gruppe am A-Ring von **3.6** resultiert dabei möglicherweise aus elektrostatischen Repulsionen zwischen der Methylgruppe und dem Carbonylmotiv von Ala149.

Bei Betrachtung der äquipotenten 2,5- (**3.23**:  $K_i = 17$  nM) und 2,6-substituierten (**3.7**:  $K_i = 36$  nM) Derivate wurde angenommen, dass der C-Ring beider Verbindungen die gleichen Interaktionen mit dem Protein eingeht und dass der Raum im aktiven Zentrum groß genug sein muss, um einen A-Ring in 5- oder 6-Position aufnehmen zu können. Von der modellierten Struktur von Verbindung **3.23** (**Abb. 3.14C**, **Abschnitt 3.11**) kann angenommen werden, dass der A-Ring in 5-Position gut in die aktive Tasche passt und über hydrophobe Wechselwirkungen mit Met199 in Kontakt steht. Weiterhin zeigte auch die modellierte Struktur vom 2,5,6-trisubstituierten Derivat **3.31** ( $K_i = 9$  nM), dass Verbindungen mit zwei Ringen in 5- und in 6-Position Platz in der aktiven Tasche finden und über ein mögliches intramolekulare  $\pi$ -stacking miteinander interagieren ( $d = 4$  Å, **Abb. 3.14D**, **Abschnitt 3.11**).

### Betrachtung des B-Ring Abschnitts

Die Untersuchung der Wichtigkeit des Stickstoffatoms am B-Ring zeigt, dass Inhibitor **3.11** ( $K_i = 64$  nM) und das Phenylanalogon **3.29** ( $K_i = 21$  nM) eine ähnliche Affinität aufweisen. Es ist naheliegend, dass das Stickstoffatom keine spezifischen Interaktionen mit dem Protein eingeht, was mit Hilfe der Kristallstrukturen bestätigt werden kann. Dennoch erhöht das Pyridinstrukturmotiv die Löslichkeit der Verbindungen dieser Inhibitorklasse. Hinsichtlich des *N*-Oxids **3.30** ( $K_i = 132$  nM) ist die zuvor beschriebene Interaktion zwischen der 3-OH Gruppe am A-Ring von Verbindung **3.11** mit Ala149 nicht länger zu beobachten. Stattdessen adressiert diese Hydroxygruppe die *backbone* Carbonylgruppe von Gln180, wie man es in der Modellstruktur (**Abb. 3.14E**, **Abschnitt 3.11**) entnehmen kann. Eine zusätzliche H-Brückenbindung der  $N^+-O^-$  Gruppe mit Gln148 könnte demnach ebenfalls möglich sein. Allerdings scheint der Nachteil durch die hohe Desolvationsenergie durch die Einführung der geladenen funktionellen Gruppe so groß zu sein, dass der zusätzliche Kontakt zum Protein energetisch kompensiert wird. Dies führt in Summe zu keinem Gewinn an Affinität.

### 3.8.3 Zweite Bindetasche von Verbindung **3.8**

Für Verbindung **3.8** kann ein zweiter Bindungsmodus an der Kontaktfläche zweier Tetramereinheiten beobachtet werden. Während der Kristallstrukturverfeinerung war eine Belegung von 80% dieser zusätzlichen Bindestelle festzustellen. Dies lässt annehmen, dass der Inhibitor eine geringere Affinität zu dieser Region im Vergleich zur aktiven Tasche besitzt. Die Bindung des Liganden in dieser Position könnte irrelevant für die biologische Aktivität der Enzymhemmung sein. Die Lokalisation

von Verbindung **3.8** in dieser Position könnte ein Artefakt sein, das durch die Kristallpackung entstanden ist, da die Bindung an der Kontaktfläche keine Konformationsänderung der ternären Struktur und der Ligandenbindetasche hervorruft. Dennoch ist es erstaunlich, dass MICHIELS *et al.*<sup>37</sup> nach ihren NMR Untersuchungen berichteten, dass Phytoestrogene ebenfalls an der Schnittfläche des 17 $\beta$ -HSD1 Dimers binden können.

### **3.8.4 Vergleich der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD1, 17 $\beta$ -HSD2 und 17 $\beta$ -HSD14**

Bereits bei der Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD1 Inhibitoren<sup>4</sup> und 17 $\beta$ -HSD2 Inhibitoren,<sup>38</sup> wurde über einen positiven Einfluss eines Fluoratoms in *ortho*-Position zu einer phenolischen Hydroxygruppe berichtet. Da bislang keine Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 im Komplex mit den dort beschriebenen nichtsteroidalen Inhibitoren zugänglich sind, bleibt deren Bindungsmodus bislang unaufgeklärt. Da die 17 $\beta$ -HSD Subtypen 1, 2 und 14 zu derselben SDR Enzymfamilie gehören, teilen sie Ähnlichkeiten in der Region nahe der katalytischen Triade. Auch kann die Anwesenheit des komplexen H-Brückennetzwerks bei der Untersuchung der Kristallstruktur vom Subtyp 1 (PDB ID: 1FDT) beobachtet werden. Somit ist anzunehmen, dass 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 Inhibitoren mit einer aziden Phenolgruppe einen ähnlichen Bindungsmodus wie in den hier vorgestellten Kristallstrukturen aufweisen. Demnach sind diese Strukturen von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit nichtsteroidalen Inhibitoren nützliche Vergleichsdaten für Dockingstudien mit 17 $\beta$ -HSD1 und Homologiemodellierungen mit 17 $\beta$ -HSD2.

### **3.8.5 Basis für ein weiteres strukturbasiertes Wirkstoffdesign**

Basierend auf den beschriebenen Resultaten sollte es möglich sein die vorgestellten Liganden durch ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign zu optimieren. In der Klasse der 2,6-substituierten Pyridinketone ist deutlich geworden, dass die Interaktionen mit dem katalytischen Tyr154 und Ser141, sowie die Interaktion mit Ala149 wichtig sind um das Strukturgerüst der Liganden in der korrekten Position zu verankern. Spezifische Interaktionen mit His93 und Gln148 sollten weiterhin in einer verbesserten Aktivität sowie Selektivität resultieren, da insbesondere His93 in keinem anderen humanen 17 $\beta$ -HSD Enzym zu finden ist. Auch sollte die Adressierung des Wassermoleküls W1 zu weiteren Interaktionen mit dem Protein führen. Da die aktive Tasche offen und wasserexponiert ist, sollte ebenfalls die Bildung von spezifischen Interaktionen mit polaren Aminosäuren in der näheren Nachbarschaft zur aktiven Tasche angestrebt werden.

### 3.9 Fazit

Nichtsteroidale 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren konnten identifiziert werden von denen die „hit“-Verbindung **3.4**, eine Substanz aus der 2,6-substituierten Pyridinklasse aus einer vorangegangenen Studie von 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 Inhibitoren, einen  $K_i \sim 250$  nM besitzt. Diese wurde optimiert, was in sechs hochaktiven Verbindungen mit  $K_i < 15$  nM resultierte wobei drei Verbindungen einen  $K_i = 7$  nM aufweisen. Effekte, die während des Optimierungsprozesses durch die Einführung von Substituenten hervorgerufen wurden, konnten richtig eingeschätzt werden. Es ist naheliegend, dass eine azide Hydroxygruppe in 3-Position des C-Rings essentiell ist um eine starke Potenz zu erzielen. Diese interagiert über starke H-Brückenbindungen mit Tyr154 und Ser141, wobei diese Interaktionen durch die Ausbildung eines weitreichenden Wassernetzwerks stabilisiert werden. Die Struktur-Wirkungsbeziehung für den A-Ring zeigte auf, dass eine Hydroxygruppe sowohl in 3- wie 4-Position die inhibitorische Aktivität erhöhen, indem sie mit Ala149 interagieren.

Die Kristallstrukturen des Proteins im Komplex mit den Inhibitoren bestätigen die relativ große aktive Tasche, die durch das C-terminale Ende des benachbarten Monomers verkleinert wird.

Vor allem die hinsichtlich ihrer Aktivität interessantesten 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren zeigen ebenfalls gute physikochemische Eigenschaften, die mit einer guten Bioverfügbarkeit in Verbindung gebracht werden können. Weiterhin weisen sie ein günstiges Selektivitätsprofil gegenüber den nahe verwandten Subtypen 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 auf. Die erhaltenen Kristallstrukturen ermöglichen neue Erkenntnisse, um das Zielprotein zu charakterisieren und um den Bindungsmodus der dargestellten nichtsteroidalen Inhibitoren zu verstehen. Zusätzlich dienen die Strukturen als Basis zur weiteren strukturbasierten Optimierung der Inhibitoren.

## 3.10 Experimental Section

### 3.10.1 Chemistry

#### Chemical methods

Chemical names follow IUPAC nomenclature.

Starting materials were purchased from Acros Organics, Alfa Aesar, Combi-Blocks, Roth and Sigma Aldrich and were used without further purification. Anhydrous tetrahydrofuran was freshly distilled from sodium benzophenone ketyl.

Microwave irradiation experiments were carried out in a CEM-Discover apparatus.

Column chromatography was performed on silica gel (0.04-0.063 mm, Macherey-Nagel) and reaction progress was monitored by TLC on aluminium sheets (Silicagel 60 F254, Merck). Visualization was accomplished with UV light at 254 nm and 366 nm, respectively.

Preparative HPLC was performed with a Varian PrepStar 218 gradient system using a ProStar 320 detector. A ProntoSIL C18 column (5.0  $\mu$ m, 120 Å, 250-32 mm) was used with an acetonitrile/water gradient containing 0.1% TFA at a flow rate of 20 ml/min. All solvents were HPLC grade. Detection was performed at a wavelength of 254 nm.

Mass spectrometry was performed on a Q-Trap 2000 (Applied Biosystems) equipped with an electrospray interface (ESI).

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were measured on a JEOL ECX-400 spectrometer (at 400 MHz and 100 MHz, respectively). Chemical shifts are reported in  $\delta$  (parts per million: ppm), using residual peaks for the deuterated solvents as internal standard:<sup>39</sup> 2.05 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 29.8 ppm and 206.3 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR), acetone- $d_6$ ; 7.26 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 77.2 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR),  $\text{CDCl}_3$ ; 2.50 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 39.5 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR), DMSO- $d_6$ . Signals are described as s, bs, d, t, q, dd, ddd, dt and m for singlet, broad signal, doublet, triplet, doublet of doublets, doublet of doublet of doublets, doublet of triplets and multiplet, respectively. All coupling constants ( $J$ ) are given in Hertz (Hz).

Infrared spectroscopy was performed on a Bruker ALPHA FT-IR spectrometer as neat sample.

All tested compounds have  $\geq 95\%$  chemical purity as evaluated by HPLC. The Shimadzu-system consisted of a LC-20AT pump, an SIL-20A autosampler and a SPD-M20A PDA detector. The system was operated by the standard software LCsolution. A RP C18 NUCLEODUR<sup>®</sup> (125 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m) column (Macherey-Nagel) was used. All solvents were HPLC grade. In a gradient run the percentage of acetonitrile in water was increased from initial concentration of 30% at 0 min to 90% at 15 min and kept at 90% for 5 min. The injection volume was 20  $\mu$ l at a flow rate of 1.00 ml/min. UV spectra were recorded at a wavelength of 254 nm.

Marvin sketch was used for the calculation of the  $\text{pK}_a$  data (Marvin 15.9.14, 2015, Chemaxon (<http://www.chemaxon.com>)).



The following compounds were prepared according to previously described procedures: (3.9g),<sup>11</sup> (3.9f),<sup>12</sup> (3.14d),<sup>40</sup> (3.31f),<sup>41</sup> (3.33f),<sup>9</sup> (using commercial POBr<sub>3</sub>, max. temp: 150 °C), (3.33e).<sup>9</sup>

## General procedures

### General procedures for alcohol formation

#### Method 3.A1

A solution of *n*-BuLi (1.0 eq, 2.5 M in hexane) was diluted with anhydrous tetrahydrofuran to a concentration of 0.8 M and arylbromide (1.0 eq) in anhydrous tetrahydrofuran was slowly added at -80 °C under argon. The resulting solution was stirred for 15 min at -80 °C. Then the appropriate aldehyde (1.0 eq) was added and the reaction solution was stirred for additional 15 min at -80 °C followed by room temperature for 2 h. The mixture was quenched with saturated ammonium chloride and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

#### Method 3.A2

A mixture of arylbromide (1.0 eq), magnesium turnings (1.1 eq) and a catalytic amount of iodine in anhydrous tetrahydrofuran was stirred for 2 h at 60 °C under argon. A solution of the appropriate aldehyde in anhydrous tetrahydrofuran was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C. The end of the reaction was monitored by TLC. The mixture was quenched with brine and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### General procedure for alcohol oxidation

#### Method 3.B

2-Iodoxybenzoic acid (1.2 eq) was added to a solution of alcohol derivative (1.0 eq) in tetrahydrofuran and the reaction mixture was stirred at 60 °C. After the end of the reaction (monitored by TLC) the mixture was cooled to room temperature, quenched with saturated sodium thiosulfate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water and saturated sodium bicarbonate, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### General procedures for SUZUKI-MIYAURA couplings

#### Method 3.C1

A mixture of arylbromide (1.0 eq), boronic acid (1.2 eq), cesium carbonate (4.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.02 eq) was solved in DME/water (2:1) and degassed with argon. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The reaction mixture was cooled to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

#### Method 3.C2

A mixture of arylbromide (1.0 eq), boronic acid (1.2 eq), sodium carbonate (2.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.02 eq) was solved in DME/water (2:1) and degassed with argon. The mixture was exposed to microwave irradiation (60 min, 150 W, 150 °C) and quenched with water after reaching room temperature. The mixture was extracted with ethyl acetate and the combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### General procedure for the amination of bromopyridine derivatives

#### Method 3.D

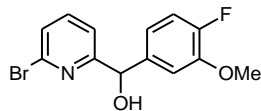
A mixture of bromopyridine derivative (1.0 eq), appropriate *N*-heterocycle (1.1 eq) and potassium phosphate (4.0 eq) in 1,4-dioxane was stirred at 100 °C. At the end of the reaction (monitored by TLC) the mixture was cooled to room temperature, quenched with 1.0 M sodium hydroxide and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### General procedure for ether cleavage

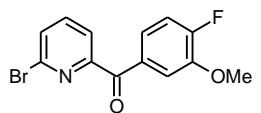
#### Method 3.E

A solution of methoxy derivative (1.0 eq) in dry dichloromethane was cooled to -80 °C and boron tribromide (1.0 M in dichloromethane, 5.0 eq per methoxy function) was slowly added under argon. The reaction mixture was stirred at -80 °C for 1 h and then allowed to warm to room temperature overnight. The mixture was cooled in an ice bath, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

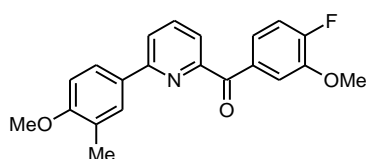
## Detailed synthesis procedures and compounds characterization

 (6-Bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanol (**3.6c**).


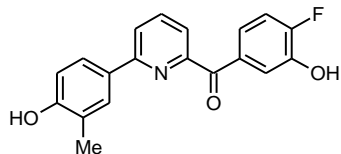
According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (1.18 g, 5.0 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (**3.6e**) (0.77 g, 5.0 mmol, 1.0 eq). The crude product was used in the next step without further purification.  $C_{13}H_{11}BrFNO_2$ ; MW: 312;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.49 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.39 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.12 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.02 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.02 (dd,  $J$  = 13.9 Hz, 8.2 Hz, 1H), 6.88 (ddd,  $J$  = 8.2 Hz, 4.3 Hz, 2.1 Hz, 1H), 5.68 (d,  $J$  = 3.9 Hz, 1H), 4.56 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H); MS (ESI): 312, 314 ( $M+H$ ) $^+$ .

 (6-Bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**).


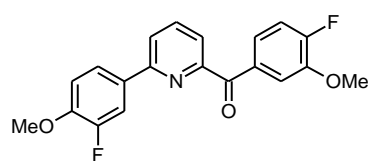
According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of the previously obtained (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanol (**3.6c**) with 2-iodoxybenzoic acid (1.68 g, 6.0 mmol, 1.2 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 8:1) to give 1.17 g (3.7 mmol, 75%, two steps) of the analytically pure compound.  $C_{13}H_9BrFNO_2$ ; MW 310;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.01 (dd,  $J$  = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.92 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.80-7.74 (m, 2H), 7.69 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  189.7, 155.9 (d,  $J$  = 256.3 Hz), 155.6, 147.7 (d,  $J$  = 10.8 Hz), 140.7, 139.6, 132.1 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 131.0, 125.9 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 123.7, 115.9 (d,  $J$  = 8.7 Hz), 115.8 (d,  $J$  = 6.8 Hz), 56.4; MS (ESI): 310, 312 ( $M+H$ ) $^+$ .

 (4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.6a**).


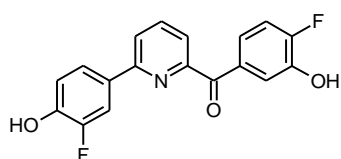
According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (**3.6b**) (123 mg, 0.40 mmol, 1.0 eq) with 4-methoxy-3-methylphenylboronic acid (79 mg, 0.48 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1) to give 131 mg (0.38 mmol, 95%) of the analytically pure compound.  $C_{21}H_{18}FNO_3$ ; MW: 351;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.00 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.95-7.82 (m, 6H), 7.18 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 6.91 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 2.28 (s, 3H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  192.0, 159.2, 155.9, 155.6 (d,  $J$  = 254.9 Hz), 154.6, 147.5 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 137.9, 133.0 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 130.5, 129.2, 127.2, 126.1 (d,  $J$  = 7.8 Hz), 125.8, 122.3, 121.9, 116.1 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 115.6 (d,  $J$  = 18.9 Hz), 110.2, 56.4, 55.6, 16.6; MS (ESI): 352 ( $M+H$ ) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(4-hydroxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone hydrochloride salt (3.6).**

According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.6a**) (110 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.1 ml, 3.1 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) and the hydrochloride salt was prepared by means of 2 M hydrogen chloride solution in ether to give 85 mg (0.24 mmol, 75%) of the analytically pure compound.  $C_{19}H_{14}FNO_3 \cdot HCl$ ; MW: 360; **mp**: 194-195 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  10.29 (bs, 1H), 9.71 (bs, 1H), 8.12-7.96 (m, 2H), 7.85-7.81 (m, 1H), 7.79-7.73 (m, 1H), 7.71 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.56 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.33 (dd,  $J$  = 11.0 Hz, 8.5 Hz, 1H), 6.89 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  191.9, 157.1, 155.4, 154.2 (d,  $J$  = 248.2 Hz), 154.1, 144.8 (d,  $J$  = 12.5 Hz), 138.3, 132.7 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 129.3, 128.5, 125.6, 124.2, 123.2 (d,  $J$  = 7.8 Hz), 121.7, 121.3, 120.0 (d,  $J$  = 4.4 Hz), 116.0 (d,  $J$  = 19.1 Hz), 114.9, 16.2; **IR**: 3390, 1661, 1611, 1597, 1583, 1526, 1510, 1427, 1235, 1119, 756  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 324 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 12.29 min; peak area, 97.6%.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.7a).**

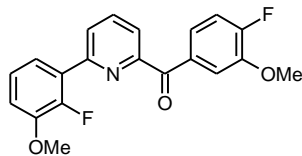
According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (**3.6b**) (151 mg, 0.49 mmol, 1.0 eq) with 3-fluoro-4-methoxyphenylboronic acid (100 mg, 0.59 mmol, 1.2 eq) DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 160 mg (0.45 mmol, 92%) of the analytically pure compound.  $C_{20}H_{15}F_2NO_3$ ; MW: 355;  $^1H$  NMR (CDCl $_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.99-7.93 (m, 3H), 7.90-7.76 (m, 4H), 7.19 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.05 (t,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 6H);  $^{13}C$  NMR (CDCl $_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.8, 155.7 (d,  $J$  = 258.2 Hz), 154.8, 154.5, 152.8 (d,  $J$  = 245.7 Hz), 149.0 (d,  $J$  = 10.8 Hz), 147.6 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 138.2, 132.9 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 131.6 (d,  $J$  = 6.3 Hz), 126.0 (d,  $J$  = 7.9 Hz), 122.9, 122.9 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 121.9, 115.9 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 115.7 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 114.7 (d,  $J$  = 19.9 Hz), 113.4 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 56.4; **MS** (ESI): 356 (M+H) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone hydrochloride salt (3.7).**

According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(3-fluoro-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.7a**) (148 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide

(4.2 ml, 4.2 mmol, 10 eq) in dichloromethane (8.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) and the hydrochloride salt was prepared by means of 2 M hydrogen chloride solution in ether to give 92 mg (0.25 mmol, 61 %) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{11}F_2NO_3 \cdot HCl$ ; MW: 364; mp: 206-207 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.16 (dd,  $J$  = 8.1 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.11 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 7.5 Hz, 1H), 7.93 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.90 (dd,  $J$  = 3.2 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.88-7.82 (m, 2H), 7.72 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.13 (t,  $J$  = 8.7 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.3, 155.6, 155.4 (d,  $J$  = 249.3 Hz), 155.2 (d,  $J$  = 2.35 Hz), 152.6 (d,  $J$  = 240.0 Hz), 147.2 (d,  $J$  = 12.9 Hz), 145.5 (d,  $J$  = 13.3 Hz), 139.3, 134.2 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 131.6 (d,  $J$  = 5.9 Hz), 124.8 (d,  $J$  = 7.47 Hz), 124.11 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 123.0, 122.6, 121.3 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 118.9 (d,  $J$  = 3.0 Hz), 116.6 (d,  $J$  = 19.2 Hz), 115.3 (d,  $J$  = 20.0 Hz); IR: 3380, 1660, 1598, 1582, 1524, 1430, 1235, 754  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 328 (M+H) $^+$ ; HPLC analysis: retention time = 11.63 min; peak area, 98.8%.

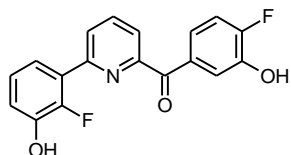
**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.8a).**



According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (152 mg, 0.49 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (100 mg, 0.59 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product

was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 165 mg (0.46 mmol, 95%) of the analytically pure compound.  $C_{20}H_{15}F_2NO_3$ ; MW: 355;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.06-7.93 (m, 4H), 7.85 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.51 (ddd,  $J$  = 8.2 Hz, 6.7 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.16 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.04 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.94 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.6, 155.7 (d,  $J$  = 255.2 Hz), 154.9, 152.2 (d,  $J$  = 1.9 Hz), 150.9 (d,  $J$  = 250.6 Hz), 148.5 (d,  $J$  = 10.1 Hz), 147.6 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 137.9, 132.8 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 127.5 (d,  $J$  = 9.0 Hz), 127.1 (d,  $J$  = 9.9 Hz), 126.0 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 124.3 (d,  $J$  = 4.8 Hz), 123.5, 122.0 (d,  $J$  = 1.8 Hz), 115.9 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 115.7, 114.0 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 56.6, 56.4; MS (ESI): 356 (M+H) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone hydrochloride salt (3.8).**

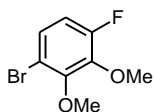


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.8a**) (126 mg, 0.35 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.5 ml, 3.5 mmol, 10 eq) dichloromethane (6.0 ml). The crude product

was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) and the hydrochloride salt was prepared by means of 2 M hydrogen chloride solution in ether to give 117 mg (0.32 mmol, 92%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{11}F_2NO_3 \cdot HCl$ ; MW: **364**; mp: 198-199 °C;  $^1H$  NMR (DMSO-

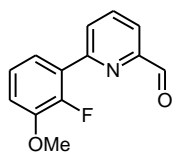
$d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.15 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 8.00 (ddd,  $J$  = 7.9 Hz, 2.1 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.92 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.70-7.64 (m, 1H), 7.55 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J$  = 11.0 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.29-7.22 (m, 1H), 7.12-7.04 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  191.7, 154.6, 154.3 (d,  $J$  = 125.5 Hz), 151.9, 149.2 (d,  $J$  = 146.2 Hz), 145.6 (d,  $J$  = 12.6 Hz), 144.9 (d,  $J$  = 12.4 Hz), 138.4, 132.5, 127.3 (d,  $J$  = 9.1 Hz), 126.7 (d,  $J$  = 8.1 Hz), 124.4 (d,  $J$  = 4.1 Hz), 123.3 (d,  $J$  = 7.5 Hz), 122.9, 120.2, 119.8 (d,  $J$  = 4.5 Hz), 118.5 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 116.0 (d,  $J$  = 19.3 Hz); IR: 3155, 1655, 1593, 1481, 1293, 1225, 750  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI): 328 (M+H) $^+$ ; HPLC analysis: retention time = 10.82 min; peak area, 98.4%.

### 1-Bromo-4-fluoro-2,3-dimethoxybenzene (3.9e).

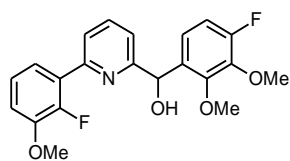


A mixture of 3-bromo-6-fluorobenzene-1,2-diol (3.9f) (785 mg, 3.79 mmol, 1.0 eq), methyl iodide (0.70 ml, 11.4 mmol, 3.0 eq) and potassium carbonate (1.57 g, 11.4 mmol, 3.0 eq) in dimethylformamide (10 ml) was stirred at room temperature overnight. The mixture was acidified with 1.0 M HCl and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated sodium bicarbonate and brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was used in the next step without further purification.  $\text{C}_8\text{H}_8\text{BrFO}_2$ ; MW: 235;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.19 (ddd,  $J$  = 9.0 Hz, 5.5 Hz, 1.1 Hz, 1H), 6.78 (ddd,  $J$  = 10.1 Hz, 9.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 3.96 (t,  $J$  = 1.1 Hz, 3H), 3.91 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  155.8 (d,  $J$  = 248.0 Hz), 151.4 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 142.7 (d,  $J$  = 12.5 Hz), 126.5 (d,  $J$  = 8.8 Hz), 113.0 (d,  $J$  = 20.6 Hz), 112.1 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 61.8 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 61.3; MS (ESI): 235, 237 (M+H) $^+$ .

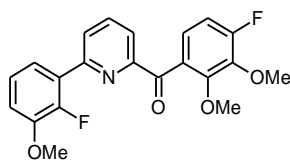
### 6-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine-2-carbaldehyde (3.9c).



According to method 3.C1 the title compound was prepared by reaction of 6-bromopyridine-2-carbaldehyde (3.9d) (372 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (408 mg, 2.5 mmol, 1.2 eq) in DME/water (24 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 367 mg (1.59 mmol, 79%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{FNO}_2$ ; MW: 231;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  10.15 (s, 1H), 8.04-7.99 (m, 1H), 7.97-7.91 (m, 2H), 7.63 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.7 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.23 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.07 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.6 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  193.8, 154.0 (d,  $J$  = 1.6 Hz), 152.9, 150.8 (d,  $J$  = 250.5 Hz), 148.4 (d,  $J$  = 11.2 Hz), 137.7, 128.9 (d,  $J$  = 9.6 Hz), 127.2 (d,  $J$  = 9.0 Hz), 124.5 (d,  $J$  = 4.8 Hz), 122.1 (d,  $J$  = 1.7 Hz), 120.3, 114.3 (d,  $J$  = 2.0 Hz), 56.6; MS (ESI): 264 (M+H) $^+$ .

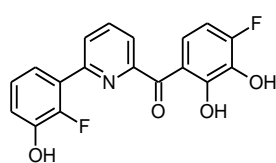
**(4-Fluoro-2,3-dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanol (3.9b).**


According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine-2-carbaldehyde (**3.9c**) (169 mg, 0.73 mmol, 1.0 eq) with 1-bromo-4-fluoro-2,3-dimethoxybenzene (**3.9e**) (171 mg, 0.73 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 76 mg (0.20 mmol, 27%) of the analytically pure compound.  $C_{21}H_{19}F_2NO_4$ ; MW: 387;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.74-7.67 (m, 2H), 7.57 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.7 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.24-7.16 (m, 2H), 7.05 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.5 Hz, 1H), 6.99 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 6.0 Hz, 1H), 6.82 (dd,  $J$  = 10.5 Hz, 8.8 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 3.97 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.91 (s, 3H); **MS** (ESI): 388 ( $M+H$ ) $^+$ .

**(4-Fluoro-2,3-dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.9a).**


According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-2,3-dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanol (**3.9b**) (76 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (67 mg, 0.24 mmol, 1.2 eq) for 3 h. The crude

product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 19:1) to give 54 mg (0.14 mmol, 70%) of the analytically pure compound.  $C_{21}H_{17}F_2NO_4$ ; MW: 385;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.03-7.92 (m, 3H), 7.42 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.7 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 6.0 Hz, 1H), 7.09 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.99 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.94 (dd,  $J$  = 10.1 Hz, 8.7 Hz, 1H), 3.93 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.65 (s, 3H); **MS** (ESI): 386 ( $M+H$ ) $^+$ .

**(4-Fluoro-2,3-dihydroxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.9).**


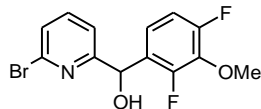
According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-2,3-dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.9a**) (69 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (2.7 ml, 2.7 mmol, 15 eq) in dichloromethane (4.0 ml). The crude product

was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1, 3% acetic acid) to give 50 mg (0.15 mmol, 81%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{11}F_2NO_4$ ; MW: 343; **mp**: 174-175  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  12.91 (bs, 1H), 8.89 (bs, 1H), 8.42 (bs, 1H), 8.22 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 8.09 (ddd,  $J$  = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 8.02 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J$  = 9.2 Hz, 6.1 Hz, 1H), 7.41 (ddd,  $J$  = 7.4 Hz, 6.4 Hz, 2.8 Hz, 1H), 7.18-7.10 (m, 2H), 6.77 (dd,  $J$  = 10.2 Hz, 9.2 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  197.0, 156.0 (d,  $J$  = 249.0 Hz), 155.0 (d,  $J$  = 8.2 Hz), 153.1 (d,  $J$  = 1.8 Hz), 150.6 (d,  $J$  = 245.3 Hz), 146.5 (d,  $J$  = 13.6 Hz), 139.5, 135.0 (d,  $J$  = 13.2 Hz), 128.1 (d,  $J$  = 9.2 Hz), 127.9 (d,  $J$  = 8.5 Hz), 126.4 (d,  $J$  = 10.0 Hz), 125.4 (d,  $J$  = 4.6 Hz), 124.2, 122.0 (d,  $J$  = 1.2 Hz), 119.6 (d,  $J$  = 2.9 Hz), 117.3 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 108.2, 108.0; **IR**: 3447,



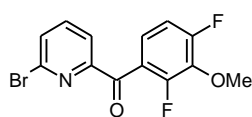
3368, 1630, 1582, 1510, 1480, 1434, 1307, 1248, 990, 765, 743  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 344 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 11.46 min; peak area, 99.5%.

**(6-Bromopyridin-2-yl)(2,4-difluoro-3-methoxyphenyl)methanol (3.10c).**



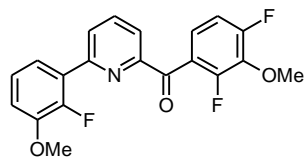
According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (1.18 g, 5.00 mmol, 1.0 eq) with 2,4-difluoro-3-methoxybenzaldehyde (**3.10d**) (0.86 g, 5.00 mmol, 1.0 eq). The crude product was used in the next step without further purification.  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrF}_2\text{NO}_2$ ; MW: 330; **MS** (ESI): 330, 332 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

**(6-Bromopyridin-2-yl)(2,4-difluoro-3-methoxyphenyl)methanone (3.10b).**



According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,4-difluoro-3-methoxyphenyl)methanol (**3.10c**) with 2-iodoxybenzoic acid (1.68 g, 6.0 mmol, 1.2 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 19:1) to give 1.01 g (3.08 mmol, 62%, two steps) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{BrF}_2\text{NO}_2$ ; MW 328; **<sup>1</sup>H NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.99 (dd,  $J$  = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.76 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.39 (ddd,  $J$  = 8.6 Hz, 7.2 Hz, 5.9 Hz, 1H), 7.01 (dd,  $J$  = 10.5 Hz, 3.2 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  190.2 (d,  $J$  = 2.6 Hz), 158.8 (dd,  $J$  = 253.7 Hz, 3.9 Hz), 155.5 (dd,  $J$  = 257.0 Hz, 6.1 Hz), 154.95, 141.4, 139.4, 136.9 (t,  $J$  = 15.3 Hz), 131.8, 125.1 (dd,  $J$  = 10.0 Hz, 3.9 Hz), 122.9 (dd,  $J$  = 12.1 Hz, 3.6 Hz), 122.4, 62.3 (t,  $J$  = 3.5 Hz); **MS** (ESI): 328, 330 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

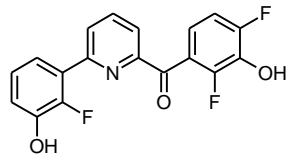
**(2,4-Difluoro-3-methoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.10a).**



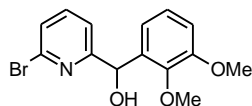
According to **method 3.C2** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,4-difluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.10b**) (164 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (102 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in

DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 167 mg (0.45 mmol, 89%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_3$ ; MW: 373; **<sup>1</sup>H NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.06 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 8.04-8.00 (m, 1H), 8.00-7.95 (m, 1H), 7.47-7.40 (m, 2H), 7.11 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.05-6.97 (m, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.92 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.9 (dd,  $J$  = 2.4 Hz, 0.7 Hz), 158.5 (dd,  $J$  = 254.1 Hz, 5.2 Hz), 155.3 (dd,  $J$  = 256.1 Hz, 5.7 Hz), 153.7, 152.6 (d,  $J$  = 2.0 Hz), 150.9 (d,  $J$  = 250.7 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 11.3 Hz), 137.7, 136.8 (t,  $J$  = 14.4 Hz), 128.0 (d,  $J$  = 10.3 Hz), 127.3 (d,  $J$  = 8.9 Hz), 125.3 (dd,  $J$  = 9.9 Hz, 4.1 Hz), 124.2 (d,  $J$  = 4.9 Hz), 123.8 (dd,  $J$  = 12.7 Hz, 3.7 Hz), 122.2, 122.0 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 114.0 (d,  $J$  = 2.4 Hz), 112.1 (dd,  $J$  = 19.9 Hz, 3.7 Hz), 62.2 (t,  $J$  = 3.4 Hz), 56.6; **MS** (ESI): 374 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

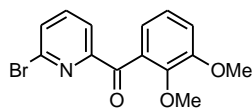


**(2,4-Difluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.10).**


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (2,4-difluoro-3-methoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl] methanone (**3.10a**) (112 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide 3.0 ml, 3.0 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 4:1, 3% acetic acid) and preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 30:70:0.1  $\rightarrow$  10:90:0.1, in 160 min) to give 62 mg (0.18 mmol, 60%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>; MW: 345; **mp**: 144-145 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.16 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.10-8.01 (m, 2H), 7.32 (ddd, *J* = 10.4 Hz, 7.9 Hz, 3.8 Hz, 1H), 7.26 (ddd, *J* = 8.8 Hz, 7.0 Hz, 6.0 Hz, 1H), 7.14 (ddd, *J* = 10.1 Hz, 8.8 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.09-7.02 (m, 2H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  192.5 (dd, *J* = 2.5 Hz, 1.1 Hz), 155.5 (dd, *J* = 247.4 Hz, 5.6 Hz), 155.0, 153.6 (d, *J* = 2.1 Hz), 150.7 (d, *J* = 248.6 Hz), 146.4 (d, *J* = 13.8 Hz), 138.9, 134.9, 128.5 (d, *J* = 9.6 Hz), 128.3 (d, *J* = 9.2 Hz), 125.2 (d, *J* = 6.1 Hz), 124.4 (dd, *J* = 12.4 Hz, 3.6 Hz), 122.5, 121.9 (d, *J* = 1.7 Hz), 121.5 (dd, *J* = 9.3 Hz, 3.7 Hz), 119.4 (d, *J* = 3.2 Hz), 112.3 (dd, *J* = 19.4 Hz, 3.5 Hz), 112.3 (dd, *J* = 19.4 Hz, 3.5 Hz); **IR**: 3289, 1665, 1618, 1596, 1465, 1449, 1319, 1273, 1071, 991, 765 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 346 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 11.62 min; peak area, 99.7%.

**(6-Bromopyridin-2-yl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanol (3.11c).**


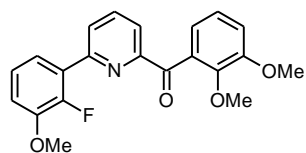
According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (474 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) with 2,3-dimethoxybenzaldehyde (**3.11d**) (332 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 538 mg (1.66 mmol, 83%) of the analytically pure compound. C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>BrNO<sub>3</sub>; MW: 323; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.04 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 7.9 Hz, 1.5 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.10 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H); **MS** (ESI): 324, 326 (M+H)<sup>+</sup>.

**(6-Bromopyridin-2-yl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanone (3.11b).**


According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanol (**3.11c**) (520 mg, 1.60 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (532 mg, 1.90 mmol, 1.2 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 380 mg (1.18 mmol, 74 %) of the analytically pure compound. C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>3</sub>; MW: 322; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.92 (dd, *J* = 7.5 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.72 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 7.9 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.16-7.06 (m, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.67 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$

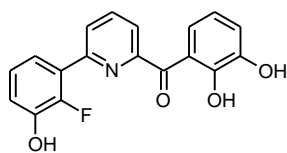
194.7, 156.4, 152.6, 148.3, 141.4, 139.2, 132.1, 131.1, 123.9, 122.2, 121.8, 116.0, 61.4, 56.1; **MS** (ESI): 322, 324 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2,3-Dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.11a).**



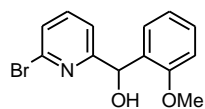
According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanone (**3.11b**) (165 mg, 0.51 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (102 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 174 mg (0.47 mmol, 93%) of the analytically pure compound. C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>FNO<sub>4</sub>; MW: 367; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.00-7.89 (m, 3H), 7.46-7.40 (m, 1H), 7.16-7.11 (m, 2H), 7.10-7.04 (m, 2H), 7.00-6.93 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.61 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  196.2, 155.2, 152.6, 152.4 (d,  $J$  = 1.8 Hz), 150.9 (d,  $J$  = 250.3 Hz), 148.3, 148.2, 137.4, 133.5, 127.4 (d,  $J$  = 8.8 Hz), 127.3 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 124.2 (d,  $J$  = 4.7 Hz), 123.7, 122.4 (d,  $J$  = 1.6 Hz), 122.0, 121.8, 115.4, 113.8 (d,  $J$  = 1.9 Hz), 61.5, 56.6, 56.2; **MS** (ESI): 368 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2,3-Dihydroxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.11).**



According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (2,3-dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.11a**) (110 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (4.5 ml, 4.5 mmol, 15 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1, 3% acetic acid) to give 77 mg (0.24 mmol, 79%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>4</sub>; MW: 325; **mp**: 193-194 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.21 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 8.08 (ddd,  $J$  = 8.0 Hz, 1.9 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.70 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.45-7.40 (m, 1H), 7.18-7.09 (m, 3H), 6.83 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  198.3, 156.1, 153.1 (d,  $J$  = 1.8 Hz), 152.1, 150.6 (d,  $J$  = 245.3 Hz), 147.3, 146.5 (d,  $J$  = 13.7 Hz), 139.4, 128.2 (d,  $J$  = 9.1 Hz), 127.7 (d,  $J$  = 8.6 Hz), 125.7, 125.4 (d,  $J$  = 4.5 Hz), 123.9, 122.0, 121.9 (d,  $J$  = 1.5 Hz), 120.6, 119.6 (d,  $J$  = 3.0 Hz), 119.5; **IR**: 3352, 3085, 1624, 1604, 1591, 1580, 1478, 1459, 1445, 1340, 1278, 1228, 1044, 706 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 326 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 10.77 min; peak area, 98.8%.

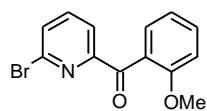
**(6-Bromopyridin-2-yl)(2-methoxyphenyl)methanol (3.12c).**



According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (1.18 g, 5.0 mmol, 1.0 eq) with 2-methoxybenzaldehyde (**3.12d**) (680 mg, 5.0 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column

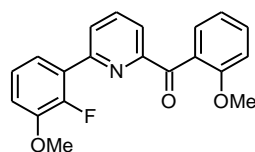
chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 1.20 g (4.08 mmol, 82%) of the analytically pure compound. C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>2</sub>; MW: 294; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.46 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.37-7.33 (m, 1H), 7.31 (dd,  $J$  = 7.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.29-7.22 (m, 2H), 6.95 (dt,  $J$  = 7.4 Hz, 0.9 Hz, 1H), 6.90 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 0.8 Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 3.85 (s, 3H); MS (ESI): 294, 296 (M+H)<sup>+</sup>.

**(6-Bromopyridin-2-yl)(2-methoxyphenyl)methanone (3.12b).**



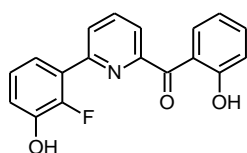
According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2-dimethoxyphenyl)methanol (**3.12c**) (1.18 g, 4.05 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (1.36 g, 4.86 mmol, 1.2 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 1.04 g (3.56 mmol, 88%) of the analytically pure compound. C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub>; MW: 292; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.89 (dd,  $J$  = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.70 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.60 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.59-7.55 (m, 1H), 7.51 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 7.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.06 (dt,  $J$  = 7.5 Hz, 0.9 Hz, 1H), 6.98 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  194.3, 159.0, 156.4, 141.2, 139.1, 133.6, 131.0, 130.8, 127.3, 122.1, 120.8, 112.1, 55.9; MS (ESI): 292, 294 (M+H)<sup>+</sup>.

**[6-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl](2-methoxyphenyl)methanone (3.12a).**



According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2-methoxyphenyl)methanone (**3.12b**) (146 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (104 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 156 mg (0.46 mmol, 92%) of the analytically pure compound. C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>3</sub>; MW: 337; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.00-7.88 (m, 3H), 7.61 (dd,  $J$  = 7.5 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.50 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 7.5 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.38 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 6.7 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.12-7.02 (m, 2H), 7.01-6.93 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.65 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  196.1, 158.7, 155.2, 152.3 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 150.9 (d,  $J$  = 250.3 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 11.5 Hz), 137.3, 132.7, 130.9, 128.3, 127.6 (d,  $J$  = 8.9 Hz), 127.1 (d,  $J$  = 10.7 Hz), 124.1 (d,  $J$  = 4.9 Hz), 122.2 (d,  $J$  = 2.2 Hz), 121.9, 120.4, 113.8 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 111.5, 56.5, 55.7; MS (ESI): 338 (M+H)<sup>+</sup>.

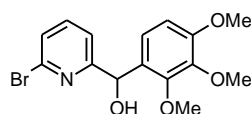
**[6-(2-Fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl](2-hydroxyphenyl)methanone (3.12).**



According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of [6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl](2-methoxyphenyl)methanone (**3.12a**) (140 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (4.2 ml, 4.2 mmol, 10 eq) in dichloromethane (8.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 70 mg (0.23 mmol, 54%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>3</sub>; MW: 309; mp: 140-141 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  12.19

(s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.30-8.24 (m, 1H), 8.20 (t,  $J = 7.85$  Hz, 1H), 8.08 (ddd,  $J = 8.0$  Hz, 2.1 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.98 (dd,  $J = 7.7$  Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.59 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 7.2 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.42 (ddd,  $J = 7.4$  Hz, 6.3 Hz, 2.9 Hz, 1H), 7.17-7.08 (m, 2H), 7.07-7.01 (m, 1H), 6.96 (ddd,  $J = 8.2$  Hz, 7.2 Hz, 1.2 Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  198.5, 164.3, 156.1, 153.1 (d,  $J = 1.8$  Hz), 150.7 (d,  $J = 245.2$  Hz), 146.5 (d,  $J = 13.6$  Hz), 139.3, 137.6, 135.6, 128.3 (d,  $J = 9.1$  Hz), 127.6 (d,  $J = 8.9$  Hz), 125.4 (d,  $J = 4.7$  Hz), 123.9, 121.9 (d,  $J = 1.6$  Hz), 119.9, 119.7, 119.5 (d,  $J = 3.2$  Hz), 118.8; IR: 3389, 1626, 1606, 1587, 1565, 1510, 1411, 1349, 747, 716  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI): 310 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; HPLC analysis: retention time = 13.83 min; peak area, 98.0%.

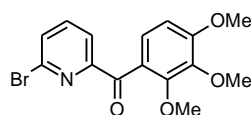
### (6-Bromopyridin-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl)methanol (3.13c).



According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (1.18 g, 5.0 mmol, 1.0 eq) with 2,3,4-trimethoxybenzaldehyde (**3.13d**) (0.98 g, 5.0 mmol, 1.0 eq). The crude product

was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 1.45 g (4.09 mmol, 82%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{BrNO}_4$ ; MW: 354;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.48 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.23 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.64 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H); MS (ESI): 354, 356 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

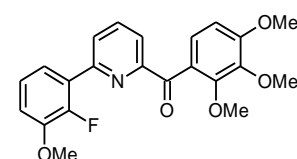
### (6-Bromopyridin-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl)methanone (3.13b).



According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,3,4-trimethoxyphenyl)methanol (**3.13c**) (1.04 g, 2.94 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (1.00 g, 3.57 mmol, 1.2 eq) for

2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 760 mg (2.16 mmol, 73%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{BrNO}_4$ ; MW: 352;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.86 (dd,  $J = 7.5$  Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.71 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.60 (dd,  $J = 7.9$  Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.75 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.72 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  193.3, 157.8, 157.4, 153.9, 141.6, 141.0, 139.2, 130.6, 126.6, 124.6, 121.9, 107.0, 61.4, 60.8, 56.3; MS (ESI): 352, 354 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

### [6-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl](2,3,4-trimethoxyphenyl)methanone (3.13a).

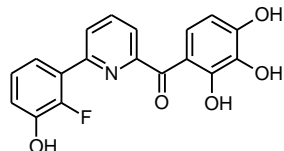


According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,3,4-dimethoxyphenyl)methanone (**3.13b**) (352 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq) with 3-fluoro-4-methoxyphenylboronic acid (205 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified

by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 373 mg (0.94 mmol, 94%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{FNO}_5$ ; MW: 397;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.00-7.89 (m,

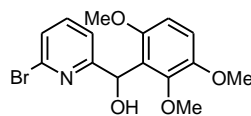
3H), 7.51-7.45 (m, 1H), 7.44 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.08 (dt,  $J = 8.1$  Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.98 (dt,  $J = 8.0$  Hz, 1.7 Hz, 1H), 6.76 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.62 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  195.0, 157.2, 156.1, 154.0, 152.0, 150.9 (d,  $J = 250.4$  Hz), 148.3, 148.2, 141.7, 137.5, 127.5 (d,  $J = 8.8$  Hz), 126.9 (d,  $J = 10.8$  Hz), 126.6, 125.7, 124.1 (d,  $J = 4.8$  Hz), 122.3 (d,  $J = 1.9$  Hz), 113.8 (d,  $J = 2.0$  Hz), 106.7, 61.5, 60.9, 56.6, 56.3; MS (ESI): 398 (M+H)<sup>+</sup>.

**[6-(2-Fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl](2,3,4-trihydroxyphenyl)methanone (3.13).**

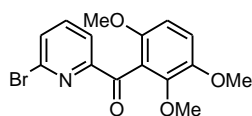


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (2,3,4-trimethoxyphenyl)[(6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)methanone (**3.13a**) (119 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (9.0 ml, 9.0 mmol, 30 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1, 3% acetic acid) and preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 80:20:0.1  $\rightarrow$  0:100:0.1, in 160 min) to give 33 mg (0.10 mmol, 32%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>5</sub>; MW: 341; mp: 137-138 °C;  $^1\text{H}$  NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  12.79 (s, 1H), 9.20 (bs, 3H), 8.15 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 8.03 (ddd,  $J = 8.0$  Hz, 2.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J = 7.7$  Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.75 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.43 (dt,  $J = 6.6$  Hz, 3.3 Hz, 1H), 7.17-7.09 (m, 2H), 6.51 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  197.0, 156.8, 154.2, 153.4, 153.1 (d,  $J = 2.2$  Hz), 150.7 (d,  $J = 245.5$  Hz), 146.5 (d,  $J = 13.7$  Hz), 139.0, 133.1, 128.5 (d,  $J = 10.4$  Hz), 128.0, 127.0 (d,  $J = 9.0$  Hz), 125.3 (d,  $J = 4.7$  Hz), 123.6, 121.8 (d,  $J = 1.7$  Hz), 119.4 (d,  $J = 3.2$  Hz), 113.4, 108.6; IR: 3323, 1629, 1569, 1509, 1478, 1436, 1286, 1246, 1190, 1159, 1001, 991, 768 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 342 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 8.99 min; peak area, 99.9%.

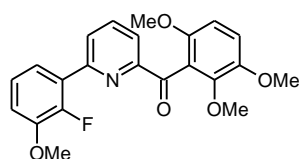
**(6-Bromopyridin-2-yl)(2,3,6-trimethoxyphenyl)methanol (3.14c).**



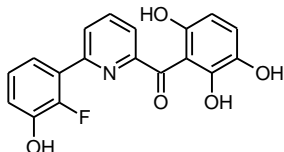
According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (1.18 g, 5.00 mmol, 1.0 eq) with 2,3,6-trimethoxybenzaldehyde (**3.14d**) (0.98 g, 5.00 mmol, 1.0 eq). The crude product was used in the next step without further purification. C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>BrNO<sub>4</sub>; MW: 354;  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.44 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.30 (dt,  $J = 7.8$  Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.22 (dt,  $J = 7.6$  Hz, 0.8 Hz, 1H), 6.81 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.57 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.71 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  164.3, 151.9, 148.2, 147.4, 140.9, 138.6, 126.0, 125.0, 119.3, 112.5, 106.6, 68.4, 61.3, 56.4, 56.3; MS (ESI): 354, 356 (M+H)<sup>+</sup>.

**(6-Bromopyridin-2-yl)(2,3,6-trimethoxyphenyl)methanone (3.14b).**


According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,3,6-trimethoxyphenyl)methanol (**3.14c**) with 2-iodoxybenzoic acid (1.46 g, 6.0 mmol, 1.2 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 1.10 g (3.12 mmol, 72%, two steps) of the analytically pure compound. C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>BrNO<sub>4</sub>; MW: 352; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.99 (dd,  $J$  = 7.5 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.69 (dd,  $J$  = 8.1 Hz, 7.6 Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 1.0 Hz, 1H), 6.94 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 6.63 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.66 (s, 3H); MS (ESI): 352, 354 (M+H)<sup>+</sup>.

**[6-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl](2,3,6-trimethoxyphenyl)methanone (3.14a).**


According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,3,6-trimethoxyphenyl)methanone (**3.14b**) (176 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (102 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 160 mg (0.40 mmol, 81%) of the analytically pure compound. C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>5</sub>; MW: 397; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.04 (dd,  $J$  = 7.6 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.99 (ddd,  $J$  = 7.9 Hz, 1.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.91 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.39 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.8 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.05 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.96 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.94 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 6.63 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.64 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  195.3, 154.1, 152.6 (d,  $J$  = 2.2 Hz), 151.6, 151.0 (d,  $J$  = 250.3 Hz), 148.2 (d,  $J$  = 11.5 Hz), 147.5, 146.9, 137.4, 127.7 (d,  $J$  = 11.4 Hz), 127.4 (d,  $J$  = 8.8 Hz), 124.6, 124.0 (d,  $J$  = 4.9 Hz), 122.4 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 121.7, 114.3, 113.7 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 106.2, 61.5, 56.8, 56.5, 56.4; MS (ESI): 398 (M+H)<sup>+</sup>.

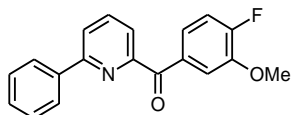
**[6-(2-Fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl](2,3,6-trihydroxyphenyl)methanone (3.14).**


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of [6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl](2,3,6-trimethoxyphenyl)methanone (**3.14a**) (117 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (6.0 ml, 6.0 mmol, 20 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1, 3% acetic acid) and preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 80:20:0.1  $\rightarrow$  50:50:0.1, in 150 min) to give 47 mg (0.14 mmol, 48%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>5</sub>; MW: 341; mp: 204–205 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  12.45 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 8.94 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 8.28 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 8.14 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.10 (ddd,  $J$  = 7.9 Hz, 2.3 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.37–7.32 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.19–7.12 (m, 2H), 7.02 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.33 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  197.1, 156.5, 155.6, 152.2 (d,  $J$  = 1.6 Hz), 150.3 (d,  $J$  = 245.2



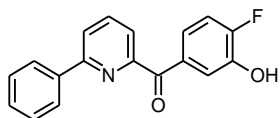
Hz), 149.1, 146.5 (d,  $J = 13.5$  Hz), 140.3, 139.4, 128.8 (d,  $J = 7.8$  Hz), 127.4 (d,  $J = 9.8$  Hz), 125.6 (d,  $J = 4.7$  Hz), 124.4, 123.6, 121.9 (d,  $J = 1.4$  Hz), 119.9 (d,  $J = 3.3$  Hz), 112.7, 107.5; **IR**: 3356, 1638, 1575, 1508, 1463, 1202, 1168, 775  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 342 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 8.58 min; peak area, 99.5%.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-phenylpyridin-2-yl]methanone (3.15a).**



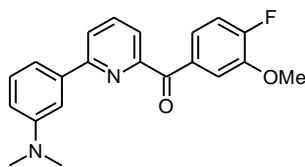
According to **method 3.C2** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (155 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with phenylboronic acid (73 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1) to give 137 mg (0.45 mmol, 89%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{FNO}_2$ ; MW: 307; **mp**: 122-123 °C;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.07-8.03 (m, 2H), 8.02-7.95 (m, 4H), 7.88 (ddd,  $J = 8.5$  Hz, 4.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.52-7.42 (m, 3H), 7.19 (dd,  $J = 10.8$  Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.9, 155.9, 155.7 (d,  $J = 255.2$  Hz), 154.8, 147.6 (d,  $J = 11.0$  Hz), 138.4, 138.1, 132.9 (d,  $J = 3.5$  Hz), 129.7, 129.1, 127.0, 126.1 (d,  $J = 8.0$  Hz), 123.2, 122.7, 116.0 (d,  $J = 3.2$  Hz), 115.6 (d,  $J = 18.9$  Hz), 56.4; **IR**: 1665, 1604, 1580, 1518, 1447, 1414, 1322, 1272, 1219, 1140, 1227, 750  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 308 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 17.26 min; peak area, 98.4%.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-phenylpyridin-2-yl]methanone (3.15).**



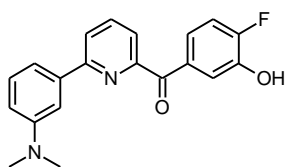
According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-phenylpyridin-2-yl]methanone (**3.15a**) (92 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.5 ml, 1.5 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 8:1) to give 73 mg (0.25 mmol, 83%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{FNO}_2$ ; MW: 293; **mp**: 181-182 °C;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  10.32 (bs, 1H), 8.23 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.14 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 8.09 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.90 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.71 (dd,  $J = 8.7$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.57 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 4.4 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.55-7.43 (m, 3H), 7.34 (dd,  $J = 10.9$  Hz, 8.6 Hz, 1H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  191.9, 155.0, 154.4, 154.3 (d,  $J = 250.3$  Hz), 144.9 (d,  $J = 12.3$  Hz), 138.8, 137.8, 132.6 (d,  $J = 3.2$  Hz), 129.6, 129.0, 126.9, 123.3 (d,  $J = 7.8$  Hz), 123.0, 122.8, 119.9 (d,  $J = 4.5$  Hz), 116.2 (d,  $J = 19.0$  Hz); **IR**: 3385, 1658, 1598, 1580, 1528, 1431, 1322, 1233, 1192, 747  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 294 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 14.45 min; peak area, 98.9%.

**[6-(3-(*N,N*-Dimethylamino)-phenyl)pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (3.16a).**



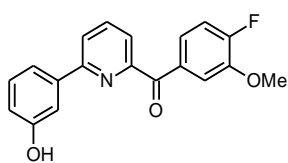
According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (155 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 3-(*N,N*-dimethylamino)-phenylboronic acid (100 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 152 mg (0.43 mmol, 87%) of the analytically pure compound.  $C_{21}H_{19}FN_2O_2$ ; MW: 350;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.01 (dd,  $J$  = 6.0 Hz, 2.8 Hz, 1H), 7.99-7.92 (m, 4H), 7.57-7.44 (m, 1H), 7.42-7.30 (m, 2H), 7.16 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.5 Hz, 1H), 6.91-6.78 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.01 (s, 6H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.9, 155.6 (d,  $J$  = 254.9 Hz), 154.5, 147.5 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 138.0, 133.1 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 129.7, 126.3 (d,  $J$  = 7.8 Hz), 123.0, 122.9, 116.0 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 115.3 (d,  $J$  = 18.8 Hz), 56.4; **MS** (ESI): 351 ( $M+H$ ) $^+$ .

**[6-(3-(*N,N*-Dimethylamino)-phenyl)pyridin-2-yl](4-fluoro-3-hydroxyphenyl)methanone trifluoroacetate salt (3.16).**



According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of [6-(3-(*N,N*-dimethylamino)-phenyl)pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (**3.16a**) (105 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.5 ml, 1.5 mmol, 5 eq) in dichloromethane (4.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) and preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 80:20:0.1  $\rightarrow$  35:65:0.1, in 120 min) to give 75 mg (0.22 mmol, 74%) of the analytically pure compound.  $C_{20}H_{17}FN_2O_2 \cdot TFA$ ; MW: 450; **mp**: 146-147  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz)\*:  $\delta$  9.06 (s, 1H), 8.17 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 8.09 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 8.00-7.92 (m, 2H), 7.82 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J$  = 2.5 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.40 (ddd,  $J$  = 7.7 Hz, 1.5 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.35-7.26 (m, 2H), 6.85 (ddd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.7 Hz, 0.8 Hz, 1H), 2.99 (s, 6H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz)\*:  $\delta$  192.1, 157.1, 155.3, 155.3 (d,  $J$  = 249.3 Hz), 152.1, 145.4, (d,  $J$  = 13.0 Hz), 139.6, 139.1, 134.3 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 130.2, 124.9 (d,  $J$  = 7.6 Hz), 123.5, 123.3, 121.6 (d,  $J$  = 4.3 Hz), 116.5 (d,  $J$  = 19.2 Hz), 115.7, 114.5, 111.7, 40.6; **IR**: 3400, 1657, 1594, 1529, 1504, 1580, 1434, 764  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 337 ( $M+H$ ) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 14.62 min; peak area, 98.9%. \*measured as base.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.17a).**

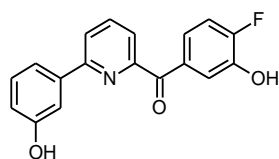


According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (155 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 3-hydroxyphenylboronic acid (83 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified



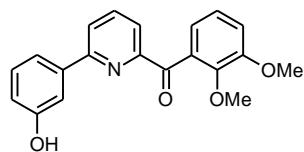
by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1 $\rightarrow$ 10:1 $\rightarrow$ 5:1 $\rightarrow$ 2:1) to give 147 mg (0.46 mmol, 76%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>3</sub>; MW: 323; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.56 (bs, 1H), 8.19-8.09 (m, 2H), 8.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.85 (ddd, *J* = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 7.8 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.37-7.28 (m, 2H), 6.97-6.92 (m, 1H), 3.96 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  191.9, 158.9, 156.3, 156.1 (d, *J* = 253.3 Hz), 155.5, 148.3 (d, *J* = 11.0 Hz), 140.6, 139.3, 134.1 (d, *J* = 3.6 Hz), 130.8, 126.1 (d, *J* = 7.9 Hz), 123.7, 123.5, 118.9, 117.5, 116.8 (d, *J* = 3.2 Hz), 116.4 (d, *J* = 18.9 Hz), 114.5, 56.5; MS (ESI): 324 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.17).**

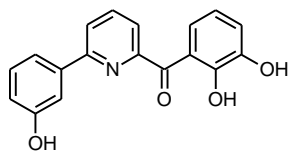


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.17a**) (97 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.0 ml, 3.0 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 91 mg (0.24 mmol, 98%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>3</sub>; MW: 309; mp: 218-219 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.75 (bs, 2H), 8.18-8.08 (m, 2H), 7.93 (dd, *J* = 7.3 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.75 (ddd, *J* = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.67-7.63 (m, 1H), 7.61 (ddd, *J* = 7.7 Hz, 1.7 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J* = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 6.94 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 2.5 Hz, 0.9 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  192.3, 158.8, 156.3, 155.8, 155.4 (d, *J* = 249.5 Hz), 145.6 (d, *J* = 13.0 Hz), 140.7, 139.2, 134.1 (d, *J* = 3.4 Hz), 130.8, 124.9 (d, *J* = 7.6 Hz), 123.5, 123.4, 121.3 (d, *J* = 4.1 Hz), 118.9, 117.4, 116.6 (d, *J* = 19.2 Hz), 114.6; IR: 3394, 1659, 1598, 1580, 1459, 1431, 1237, 755 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 310 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 11.08 min; peak area, 99.7%.

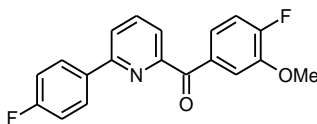
**(2,3-Dimethoxyphenyl)[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.18a).**



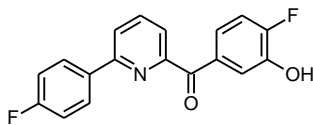
According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanone (**3.11b**) (135 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq) with 3-hydroxyphenylboronic acid (70 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 4:1) to give 136 mg (0.41 mmol, 97%) of the analytically pure compound. C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>; MW: 335; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.95-7.83 (m, 3H), 7.47-7.40 (m, 2H), 7.28-7.21 (m, 1H), 7.16-7.08 (m, 2H), 7.04 (dt, *J* = 7.5 Hz, 2.6 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.0 Hz, 2.3 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.60 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  196.5, 156.4, 156.1, 154.9, 152.6, 148.1, 139.9, 137.8, 133.4, 130.0, 123.8, 123.2, 122.0, 121.8, 119.1, 116.6, 115.4, 114.2, 61.5, 56.1; MS (ESI): 336 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2,3-Dihydroxyphenyl)[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.18).**


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (2,3-dimethoxyphenyl)[6-(3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.18a**) (101 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.7 ml, 3.7 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 4:1, 3% acetic acid) to give 68 mg (0.22 mmol, 60%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{13}NO_4$ ; MW: 307; **mp**: 149-150 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  12.6 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.20-8.13 (m, 2H), 8.04 (s, 1H), 7.96-7.89 (m, 1H), 7.70 (dt,  $J$  = 8.2 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.67-7.63 (m, 1H), 7.63-7.58 (m, 1H), 7.35 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.20-7.14 (m, 1H), 6.99-6.94 (m, 1H), 6.84 (dt,  $J$  = 2.0 Hz, 8.2 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  198.5, 158.9, 156.4, 155.9, 152.1, 147.3, 140.3, 139.7, 130.9, 125.7, 123.8, 123.6, 121.9, 120.6, 119.6, 119.1, 117.6, 114.6; **IR**: 3354, 1614, 1582, 1457, 1224, 1207, 733  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 308 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 10.50 min; peak area, 99.5%.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(4-fluorophenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.19a).**


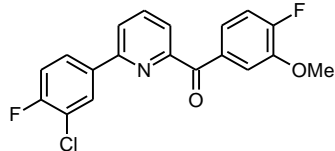
According to **method 3.C2** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (156 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 4-fluorophenylboronic acid (85 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1 $\rightarrow$ 7:1) to give 128 mg (0.33 mmol, 78 %) of the analytically pure compound.  $C_{19}H_{13}F_2NO_2$ ; MW: 325;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.04 (dd,  $J$  = 9.1 Hz, 5.4 Hz, 2H), 8.00-7.96 (m, 2H), 7.96-7.90 (m, 2H), 7.84 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.21-7.12 (m, 3H), 3.94 (s, 3H); **MS** (ESI): 326 (M+H) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(4-fluorophenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.19).**


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(4-fluorophenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.19a**) (120 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.9 ml, 1.90 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (7.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) to give 101 mg (0.32 mmol, 88%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{11}F_2NO_2$ ; MW: 311; **mp**: 207-208 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9.07 (s, 1H), 8.23-8.16 (m, 3H), 8.16-8.09 (m, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 7.85 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.73 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.34-7.20 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.3 (d,  $J$  = 1.0 Hz), 164.6 (d,  $J$  = 244.8 Hz), 155.8, 155.4 (d,  $J$  = 249.5 Hz), 155.3, 145.5 (d,  $J$  = 13.1 Hz), 139.4, 135.6 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 134.1 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 129.9 (d,  $J$  = 8.6 Hz), 124.9 (d,  $J$  = 7.7 Hz), 123.3 (d,  $J$  = 19.9 Hz), 121.2 (d,  $J$  = 4.3 Hz), 116.6 (d,  $J$  = 19.4 Hz), 116.6, 116.4; **IR**:

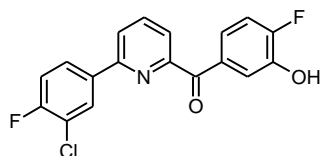
3391, 1657, 1598, 1584, 1513, 1434, 1300, 1232, 758 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 312 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 14.74 min; peak area, 99.3%.

**[6-(3-Chloro-4-fluorophenyl)pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (3.20a).**

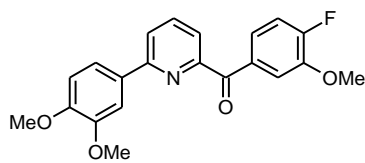


According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (154 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 3-chloro-4-fluoroboronic acid (104 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 158 mg (0.44 mmol, 88 %) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>ClF<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>; MW: 360; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.12 (dd,  $J$  = 7.1 Hz, 2.3 Hz, 1H), 8.04-7.88 (m, 5H), 7.81 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.25 (t,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.19 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  191.6, 159.1 (d,  $J$  = 252.1 Hz), 155.8 (d,  $J$  = 255.6 Hz), 155.0, 153.7 (d,  $J$  = 1.0 Hz), 147.7 (d,  $J$  = 10.8 Hz), 138.4, 135.6 (d,  $J$  = 3.9 Hz), 132.7 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 129.4, 126.8 (d,  $J$  = 7.6 Hz), 126.0 (d,  $J$  = 7.9 Hz), 123.6, 122.4, 121.9, 117.2 (d,  $J$  = 21.3 Hz), 115.9 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 115.7 (d,  $J$  = 18.9 Hz), 56.5; **MS** (ESI): 360, 362 (M+H)<sup>+</sup>.

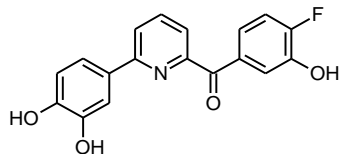
**[6-(3-Chloro-4-fluorophenyl)pyridin-2-yl](4-fluoro-3-hydroxyphenyl)methanone (3.20).**



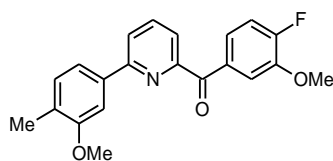
According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of [6-(3-chloro-4-fluorophenyl)pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.20a**) (115 mg, 0.32 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.6 ml, 1.6 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) to give 105 mg (0.30 mmol, 95%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>ClF<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>; MW: 346; **mp**: 208-209 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.09 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 1H), 8.29 (dd,  $J$  = 7.2 Hz, 2.2 Hz, 1H), 8.27 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 8.20-8.13 (m, 2H), 7.98 (dd,  $J$  = 7.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.85 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.71 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.46 (dd,  $J$  = 13.4 Hz, 4.5 Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  192.2, 159.6 (d,  $J$  = 150.0 Hz), 155.8, 155.5 (d,  $J$  = 249.6 Hz), 154.0 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 145.6 (d,  $J$  = 13.1 Hz), 139.7, 136.9 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 134.0 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 130.0, 128.3 (d,  $J$  = 7.7 Hz), 124.8 (d,  $J$  = 7.6 Hz), 124.0, 123.5, 121.8 (d,  $J$  = 18.1 Hz), 121.2 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 118.0 (d,  $J$  = 21.4 Hz), 116.7 (d,  $J$  = 19.2 Hz); **IR**: 3410, 1657, 1596, 1583, 1506, 1453, 1432, 1236, 755 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 346, 348 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 16.20 min; peak area, 96.2%.

**[6-(3,4-Dimethoxyphenyl)-pyridin-2-yl]-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (3.21a).**

According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (**3.21b**) (158 mg, 0.51 mmol, 1.0 eq) with 3,4-dimethoxyphenyl boronic acid (112 mg, 0.62 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 4:1) to give 178 mg (0.48 mmol, 95%) of the analytically pure compound.  $C_{21}H_{18}FNO_4$ ; MW: 367;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.97-7.88 (m, 5H), 7.69 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 7.60 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.92 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  192.0, 155.6 (d,  $J$  = 255.1 Hz) 155.5, 154.4, 150.6, 149.5, 147.6 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 138.0, 133.1 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 131.2, 126.1 (d,  $J$  = 7.9 Hz), 122.5, 122.0, 119.6, 116.0 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 115.3 (d,  $J$  = 18.8 Hz), 111.2, 109.3, 56.5, 56.1, 56.0; MS (ESI): 368 (M+H) $^+$ .

**[6-(3,4-Dihydroxyphenyl)pyridin-2-yl]-(4-fluoro-3-hydroxyphenyl)-methanone (3.21).**

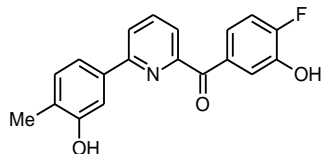
According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of [6-(3,4-dimethoxyphenyl)-pyridin-2-yl]-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (**3.21a**) (110 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.1 ml, 3.1 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol 20:1) to give 87 mg (0.27 mmol, 89%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{12}FNO_4$ ; MW: 325; mp: 180-181  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.07-8.00 (m, 2H), 7.87 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.83 (dd,  $J$  = 6.8 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.74 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.69 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.53 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.29 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.93 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.4, 156.4, 155.6, 155.4 (d,  $J$  = 249.4 Hz), 147.8, 146.3, 145.5 (d,  $J$  = 13.0 Hz), 139.0, 134.2, (d,  $J$  = 3.3 Hz), 131.3, 124.8 (d,  $J$  = 7.6 Hz), 122.4, 122.4, 121.3 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 119.8, 116.6 (d,  $J$  = 19.1 Hz), 116.3, 114.8; IR: 3388, 1661, 1599, 1583, 1526, 1235, 755  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 326 (M+H) $^+$ ; HPLC analysis: retention time = 8.98 min; peak area, 99.1%.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(3-methoxy-4-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.22a).**

According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (155 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 3-methoxy-4-methylphenylboronic acid (100 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1 $\rightarrow$ 5:1) to give 156 mg (0.44 mmol, 74 %) of the analytically pure compound.  $C_{21}H_{18}FNO_3$ ; MW: 351;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.21 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 8.11 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 8.01-7.96 (m,

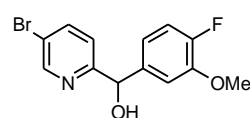
2H), 7.94 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 4.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.74 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 7.67-7.62 (m, 1H), 7.34 (dd,  $J = 11.0$  Hz, 8.4 Hz, 1H), 7.28-7.23 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 2.22 (s, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.0, 159.1, 156.4, 156.1 (d,  $J = 252.0$  Hz), 155.3, 148.3 (d,  $J = 10.9$  Hz), 139.3, 138.2, 134.2, (d,  $J = 3.7$  Hz), 131.6, 129.8, 126.4 (d,  $J = 7.9$  Hz), 123.4, 123.3, 119.5, 116.7 (d,  $J = 3.2$  Hz), 116.1 (d,  $J = 19.0$  Hz), 109.1, 56.6, 55.6, 16.2; **MS** (ESI): 352 (M+H) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(3-hydroxy-4-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.22).**

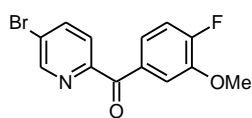


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(3-methoxy-4-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.22a**) (105 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.0 ml, 3.0 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) to give 95 mg (0.24 mmol, 98%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{FNO}_3$ ; MW: 323; **mp**: 224-225  $^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.66 (bs, 2H), 8.12-8.05 (m, 2H), 7.88 (dd,  $J = 4.7$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.86 (dd,  $J = 6.6$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.76 (ddd,  $J = 8.5$  Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.65 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 7.53 (dd,  $J = 7.8$  Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.29 (dd,  $J = 10.8$  Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.24-7.19 (m, 1H), 2.25 (s, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.3, 156.7, 156.4, 155.8, 155.4 (d,  $J = 249.5$  Hz), 145.6 (d,  $J = 12.9$  Hz), 139.1, 138.1, 134.1 (d,  $J = 3.4$  Hz), 132.0, 127.0, 124.9 (d,  $J = 7.6$  Hz), 123.2, 123.0, 121.3 (d,  $J = 4.2$  Hz), 118.8, 116.7 (d,  $J = 19.2$  Hz), 113.8, 16.1; **IR**: 3386, 1659, 1599, 1580, 1456, 1431, 1237, 756  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 324 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 12.84 min; peak area, 97.3%.

**(5-Bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanol (3.23c).**

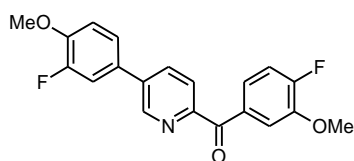


According to **method 3.A2** the title compound was prepared by reaction of 4-bromo-1-fluoro-2-methoxybenzene (**3.23e**) (417 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq), magnesium turnings (49 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) and 5-bromopyridine-2-carbaldehyde (**23d**) (417 mg, 1.1 mmol, 2.2 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1 $\rightarrow$ 5:1 $\rightarrow$ 3:1) to give 315 mg (1.0 mmol, 50%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrFNO}_2$ ; MW: 312;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.63 (dd,  $J = 2.0$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.77 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 2.3 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.03 (dd,  $J = 11.0$  Hz, 8.3 Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J = 8.1$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.87 (ddd,  $J = 7.7$  Hz, 4.2 Hz, 1.9 Hz, 1H), 5.67 (s, 1H), 4.79 (s, 1H), 3.85 (s, 3H); **MS** (ESI): 312, 314 (M+H) $^+$ .

**(5-Bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (3.23b).**


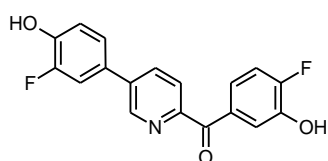
According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (5-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanol (**3.23c**) (296 mg, 0.95 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (531 mg, 1.90 mmol, 2.0 eq) for

4 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 20:1) to give 211 mg (0.68 mmol, 72 %) of the analytically pure compound.  $C_{13}H_9BrFNO_2$ ; MW: 310;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.79-8.74 (m, 1H); 8.05 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.98-7.91 (m, 1H), 7.77 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.71 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.1, 155.9 (d,  $J$  = 255.9 Hz), 153.3, 149.7, 147.9 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 140.1, 132.4 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 126.2, 125.8 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 124.6, 115.8 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 115.5 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 56.4; MS (ESI): 310, 312 ( $M+H$ ) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.23a).**


According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (5-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.23b**) (157 mg, 0.51 mmol, 1.0 eq) with 3-fluoro-4-methoxyphenylboronic acid (104 mg, 0.61 mmol, 1.2 eq) in

DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 169 mg (0.48 mmol, 94%) of the analytically pure compound.  $C_{20}H_{15}F_2NO_3$ ; MW: 355; mp: 153-154  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.89 (dd,  $J$  = 2.2 Hz, 0.7 Hz, 1H), 8.12 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 0.7 Hz, 1H), 8.03 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.82 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.77 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.45-7.40 (m, 1H), 7.40-7.38 (m, 1H), 7.17 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.4 Hz, 1H), 7.11 (t,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 3.97 (s, 6H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.8, 155.7 (d,  $J$  = 255.3 Hz), 153.5, 152.9 (d,  $J$  = 247.2 Hz), 148.6 (d,  $J$  = 10.8 Hz), 147.8 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 146.6, 137.8 (d,  $J$  = 1.9 Hz), 134.8, 133.0 (d,  $J$  = 3.7 Hz), 129.7 (d,  $J$  = 6.7 Hz), 125.8 (d,  $J$  = 7.8 Hz), 125.1, 123.4 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 115.7 (d,  $J$  = 19.1 Hz), 115.6 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 115.1 (d,  $J$  = 19.4 Hz), 114.1 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 56.5, 56.5; IR: 1652, 1605, 1583, 1513, 1412, 1303, 1266, 1148, 1122, 885  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 356 ( $M+H$ ) $^+$ ; HPLC analysis: retention time = 16.71 min; peak area, 99.6%.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[5-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone hydrochloride salt (3.23).**


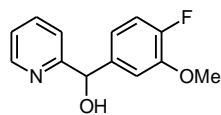
According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(3-fluoro-4-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.23a**) (124 mg, 0.35 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.5 ml, 3.5 mmol, 10 eq) in dichloromethane (7.0 ml). The crude product

was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) and the hydrochloride salt was prepared by means of 2 M hydrogen chloride solution in ether to give 113 mg (0.31 mmol, 89%)



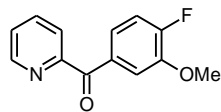
of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{11}F_2NO_3 \cdot HCl$ ; MW: 364; **mp**: 240-241 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  10.28 (bs, 2H), 9.02 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 8.30 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 8.00 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.73 (dd,  $J$  = 12.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.58-7.47 (m, 2H), 7.30 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.6 Hz, 1H), 7.12 (t,  $J$  = 8.8 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  191.3, 154.1 (d,  $J$  = 250.0 Hz), 152.6, 151.5 (d,  $J$  = 241.3 Hz), 146.0 (d,  $J$  = 12.1 Hz), 145.9, 144.8 (d,  $J$  = 12.4 Hz), 136.8, 134.5, 132.8 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 127.2 (d,  $J$  = 6.4 Hz), 124.4, 123.6 (d,  $J$  = 2.9 Hz), 123.2 (d,  $J$  = 7.6 Hz), 119.9 (d,  $J$  = 4.6 Hz), 118.5 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 115.9 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 114.9 (d,  $J$  = 19.3 Hz); **IR**: 3393, 3063, 1646, 1585, 1511, 1429, 1298, 1226, 1115  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 328 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 10.28 min; peak area, 95.4%.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(pyridin-2-yl)methanol (3.24b).**



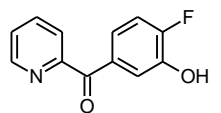
According to **method 3.A2** the title compound was prepared by reaction of 4-bromo-1-fluoro-2-methoxybenzene (**3.23e**) (205 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq), magnesium turnings (26 mg, 1.05 mmol, 1.05 eq) and pyridine-2-carbaldehyde (**24c**) (121 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq). The crude product was used in the next step without further purification.  $C_{13}H_{12}FNO_2$ ; MW: 233; **MS** (ESI): 234 (M+H) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(pyridin-2-yl)methanone (3.24a).**



According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(pyridin-2-yl)methanol (**3.24b**) with 2-iodoxybenzoic acid (560 mg, 2.0 mmol, 2.0 eq) for 4 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 8:1) to give 106 mg (0.46 mmol, 46 %, two steps) of the analytically pure compound.  $C_{13}H_{10}FNO_2$ ; MW: 231;  $^1H$  NMR (CDCl $_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.74-8.70 (m, 1H), 8.05-8.01 (m, 1H), 7.94-7.88 (m, 1H), 7.79 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.71 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.53-7.48 (m, 1H), 7.15 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H); **MS** (ESI): 232 (M+H) $^+$ .

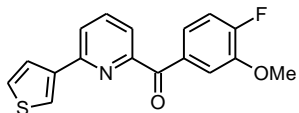
**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)(pyridin-2-yl)methanone (3.24).**



According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(pyridin-2-yl)methanone (**3.24a**) (92 mg, 0.40 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (2.0 ml, 2.0 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (8.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 23 mg (0.11 mmol, 26%) of the analytically pure compound.  $C_{12}H_8FNO_2$ ; MW: 217; **mp**: 140-141 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9.05 (bs, 1H), 8.74-8.69 (m, 1H), 8.08-8.02 (m, 1H), 7.99 (dd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.82 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.67 (ddd,  $J$  = 8.6 Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.65-7.61 (m, 1H), 7.25 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.3 (d,  $J$  = 1.0 Hz), 156.1, 155.4 (d,  $J$  = 249.2 Hz), 149.2, 145.4 (d,  $J$  = 13.2 Hz), 138.2, 134.1 (d,

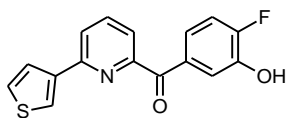
$J = 1.5$  Hz), 127.2, 125.0, 124.8 (d,  $J = 7.7$  Hz), 121.3 (d,  $J = 4.4$  Hz), 116.5 (d,  $J = 20.4$  Hz); **IR**: 3016, 1669, 1589, 1506, 1318, 1288, 749, 197, 599  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 218 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 4.74 min; peak area, 99.8%.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(thiophen-3-yl)pyridin-2-yl]methanone (3.25a).**



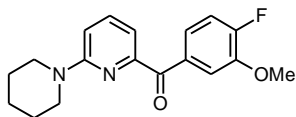
According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (115 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) with 3-thiophenylboronic acid (50 mg, 0.45 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 109 mg (0.35 mmol, 94%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FNO}_2\text{S}$ ; MW: 313;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.96-7.85 (m, 5H), 7.82 (dd,  $J = 6.0$  Hz, 3.0 Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J = 5.1$  Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.41 (dd,  $J = 5.1$  Hz, 3.0 Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J = 10.8$  Hz, 8.4 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.8, 155.6 (d,  $J = 255.2$  Hz), 154.7, 152.1, 147.5 (d,  $J = 11.0$  Hz), 141.5, 138.0, 132.9 (d,  $J = 3.5$  Hz), 126.8, 126.2, 126.0 (d,  $J = 7.9$  Hz), 124.4, 122.7, 122.5, 115.9 (d,  $J = 3.3$  Hz), 115.5 (d,  $J = 18.9$  Hz), 56.4; **MS** (ESI): 314 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(thiophen-3-yl)pyridin-2-yl]methanone hydrochloride salt (3.25).**

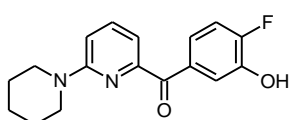


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(thiophen-3-yl)pyridin-2-yl]methanone (**3.25a**) (62 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.0 ml, 1.0 mmol, 5 eq) in dichloromethane (4.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) and the hydrochloride salt was prepared by means of 2 M hydrogen chloride solution in ether to give 22 mg (0.07 mmol, 33%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{FNO}_2\text{S}\cdot\text{HCl}$ ; MW: 336; **mp**: 208-209  $^{\circ}\text{C}$ ;  **$^1\text{H}$  NMR** (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.99 (bs, 1H), 8.16 (dd,  $J = 3.0$  Hz, 1.3 Hz, 1H), 8.11-8.04 (m, 2H), 7.89 (dd,  $J = 8.7$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J = 6.6$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.79 (dd,  $J = 5.1$  Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.77 (ddd,  $J = 8.5$  Hz, 4.0 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J = 5.1$  Hz, 3.0 Hz, 1H), 7.29 (dd,  $J = 10.8$  Hz, 8.5 Hz, 1H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.2, 155.8, 155.5 (d,  $J = 249.4$  Hz), 153.0, 145.5 (d,  $J = 13.0$  Hz), 142.6, 139.2, 134.2 (d,  $J = 3.4$  Hz), 127.6, 127.3, 125.4, 124.9 (d,  $J = 7.6$  Hz), 123.4, 123.1, 121.4 (d,  $J = 4.0$  Hz), 116.6 (d,  $J = 19.2$  Hz); **IR**: 3376, 1655, 1596, 1583, 1525, 1439, 1424, 751  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 300 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 13.90 min; peak area, 99.4%.

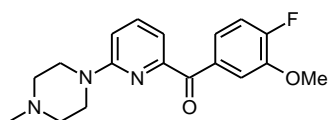


**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(piperidinyl)pyridin-2-yl]methanone (3.26a).**


According to **method 3.D** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (155 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with piperidine (59  $\mu$ l, 0.6 mmol, 1.2 eq) in 1,4-dioxane (2.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (*n*-pentane/ diethyl ether 7:1) to give 114 mg (0.36 mmol, 73 %) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{19}FN_2O_2$ ; MW: 314;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.84 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.78 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.62 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 7.3 Hz, 1H), 7.28 (dd,  $J$  = 7.3 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.12 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.60-3.47 (m, 4H), 1.71-1.58 (m, 6H); **MS** (ESI): 315 (M+H) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(piperidinyl)pyridin-2-yl]methanone hydrochloride salt (3.26).**


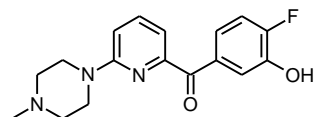
According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(piperidinyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.26a**) (95 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (4.5 ml, 4.5 mmol, 15 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) and the hydrochloride salt was prepared by means of 2 M hydrogen chloride solution in ether to give 40 mg (0.12 mmol, 40 %) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_{17}FN_2O_2 \cdot HCl$ ; MW: 337; **mp**: 100-101  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz)\*:  $\delta$  8.93 (bs, 1H), 7.80 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.70 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 7.3 Hz, 1H), 7.66 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.22 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J$  = 7.3 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.01 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 0.6 Hz, 1H), 3.65-3.51 (m, 4H), 1.70-1.61 (m, 2H), 1.63-1.52 (m, 4H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz)\*:  $\delta$  192.7 (d,  $J$  = 1.1 Hz), 158.9, 155.1 (d,  $J$  = 248.7 Hz), 154.0, 145.3 (d,  $J$  = 13.1 Hz), 139.1, 134.6 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 124.6 (d,  $J$  = 7.5 Hz), 121.2 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 116.3 (d,  $J$  = 19.1 Hz), 113.1, 110.5, 46.7, 26.1, 25.4; **IR**\*: 3276, 2936, 2856, 1645, 1588, 1486, 1462, 1447, 1418, 1255, 1236, 758  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 301 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 14.81 min; peak area, 95.1%. \*measured as base.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(4-methylpiperazinyl)pyridin-2-yl]methanone (3.27a).**


According to **method 3.D** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.6b**) (155 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 1-methylpiperazine (60 mg, 0.6 mmol, 1.2 eq) in 1,4-dioxane (2.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (ethyl acetate, 3% triethylamine) to give 90 mg (0.27 mmol, 55 %) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{20}FN_3O_2$ ; MW: 329;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.82 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.75 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 7.4 Hz, 1H), 7.34 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 7.13 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 6.84 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.64-3.52 (m, 4H), 2.57-2.45 (m, 4H),

2.35 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  192.5 (d,  $J = 1.2$  Hz), 158.1, 155.4 (d,  $J = 254.4$  Hz), 153.1, 147.4 (d,  $J = 10.3$  Hz), 138.5, 133.3 (d,  $J = 3.9$  Hz), 125.6 (d,  $J = 8.2$  Hz), 115.8 (d,  $J = 3.6$  Hz), 115.4 (d,  $J = 18.9$  Hz), 114.2, 109.8, 56.4, 54.9, 46.4, 45.1; **MS** (ESI): 330 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

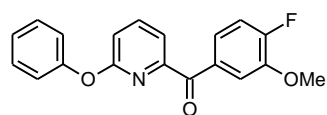
**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(4-methylpiperazinyl)pyridin-2-yl]methanone dihydrochloride salt (3.27).**



According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(4-methylpiperazinyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.27a**) (90 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (2.7 ml, 2.7 mmol, 10 eq) dichloromethane (5.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 1:1) and the hydrochloride salt was prepared by means of 2 M hydrogen chloride solution in ether to give 98 mg (0.25 mmol, 93%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$ ; MW: 388; **mp**: 216-217  $^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz)\*:  $\delta$  8.99 (bs, 1H), 7.87 (dd,  $J = 8.6$  Hz, 7.4 Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J = 8.8$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.68 (ddd,  $J = 8.5$  Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.27-7.20 (m, 2H), 4.51-4.39 (m, 2H), 4.05-3.94 (m, 2H), 3.76-3.66 (m, 2H), 3.65-3.52 (m, 2H), 3.32 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz)\*:  $\delta$  192.3 (d,  $J = 0.9$  Hz), 158.2, 155.2 (d,  $J = 248.9$  Hz), 153.9, 145.4 (d,  $J = 13.2$  Hz), 139.7, 134.3 (d,  $J = 3.5$  Hz), 124.7 (d,  $J = 7.6$  Hz), 120.9 (d,  $J = 4.2$  Hz), 116.4 (d,  $J = 19.2$  Hz), 115.5, 111.5, 54.8, 40.5, 39.9; **IR**\*: 3374, 2926, 2853, 1696, 1588, 1459, 1438, 1420, 1402, 1277, 1256, 1238, 759, 671  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 316 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 15.47 min; peak area, 97.7%.

\* measured as base.

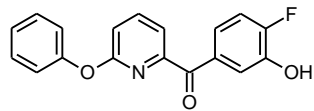
**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(6-phenoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.28a).**



A mixture of copper(I) iodide (10 mg, 0.05 mmol, 0.1 eq), picolinic acid (12 mg, 0.10 mmol, 0.2 eq), tripotassium phosphate (212 mg, 1.00 mmol, 2.0 eq), (6-bromopyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (**3.6b**) (155 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) and phenol (56 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in dry dimethyl sulfoxide (1.0 ml) was stirred for 3 d at 80  $^\circ\text{C}$  under argon atmosphere. The reaction mixture was cooled to room temperature, diluted with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (*n*-pentane/ diethyl ether 10:1) to give 48 mg (0.15 mmol, 30%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{FNO}_3$ ; MW: 323;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.89 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.79-7.71 (m, 2H), 7.40 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.20-7.10 (m, 3H), 6.91 (dd,  $J = 10.7$  Hz, 8.4 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  190.0, 162.5, 155.6 (d,  $J = 255.2$  Hz), 154.0, 152.8, 147.5 (d,  $J = 11.0$  Hz), 140.5, 132.6 (d,  $J = 3.6$  Hz), 129.8, 126.3 (d,

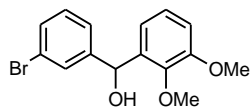
$J = 1.8$  Hz), 125.2, 121.7, 119.7, 115.6 (d,  $J = 3.3$  Hz), 115.2 (d,  $J = 18.8$  Hz), 114.8, 56.3; **MS** (ESI): 324 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)(6-phenoxy-pyridin-2-yl)methanone (3.28).**



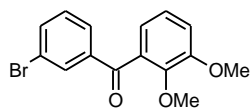
According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(6-phenoxy-pyridin-2-yl)methanone (**3.28a**) (48 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.5 ml, 1.5 mmol, 10 eq) in dichloromethane (3.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 41 mg (0.13 mmol, 89%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>3</sub>; MW: 309; **mp**: 94-95 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.89 (bs, 1H), 8.08 (dd,  $J = 8.3$  Hz, 7.4 Hz, 1H), 7.76 (dd,  $J = 7.4$  Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J = 8.7$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.60 (ddd,  $J = 8.5$  Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.49-7.38 (m, 2H), 7.28 (dd,  $J = 8.3$  Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.26-7.17 (m, 3H), 7.03 (dd,  $J = 10.8$  Hz, 8.6 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  190.7, 163.3, 155.3 (d,  $J = 249.5$  Hz), 154.9, 153.6, 145.3 (d,  $J = 13.1$  Hz), 141.9, 133.8 (d,  $J = 3.2$  Hz), 130.5, 125.7, 125.3 (d,  $J = 7.6$  Hz), 122.4, 120.8 (d,  $J = 4.2$  Hz), 120.0, 116.1 (d,  $J = 19.0$  Hz), 115.6; **IR**: 3390, 1647, 1595, 1574, 1523, 1492, 1445, 1428, 1235, 754 cm<sup>-1</sup>, **MS** (ESI): 310 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 14.10 min; peak area, 97.9%.

**(3-Bromophenyl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanol (3.29c).**



According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-dibromobenzene (**3.29d**) (1.18 g, 5.0 mmol, 1.0 eq) with 2,3-dimethoxybenzaldehyde (**3.29d**) (0.83 g, 5.0 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 1.25 g (3.87 mmol, 77%) of the analytically pure compound. C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>3</sub>; MW: 323; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.58-7.56 (m, 1H), 7.38-7.35 (m, 1H); 7.32-7.29 (m, 1H), 7.18 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.06 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.91 (ddd,  $J = 7.9$  Hz, 1.6 Hz, 0.6 Hz, 1H), 6.89 (dd,  $J = 8.2$  Hz, 1.4 Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.62 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  152.8, 146.5, 146.4, 136.9, 130.3, 129.9, 129.5, 125.1, 124.4, 122.6, 119.8, 112.3, 72.1, 60.7, 55.9; **MS** (ESI): 323, 325 (M+H)<sup>+</sup>.

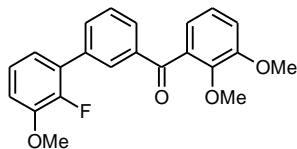
**(3-Bromophenyl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanone (3.29b).**



According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (3-bromophenyl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanol (**3.29c**) with 2-iodoxybenzoic acid (1.26 g, 4.49 mmol, 1.2 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 1.09 g (3.40 mmol, 91%) of the analytically pure compound. C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>3</sub>; MW: 321; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.96 (t,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 7.72 (ddd,  $J = 7.8$  Hz, 1.6 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.68 (ddd,  $J = 8.0$  Hz, 2.0 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.31 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.19-7.12 (m, 1H), 7.07 (dd,  $J = 8.2$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.92 (dd,  $J = 7.5$  Hz, 1.6 Hz,

1H), 3.91 (s, 3H), 3.71 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  195.0, 152.9, 147.1, 139.6, 136.1, 133.5, 132.6, 130.0, 128.7, 124.3, 122.7, 120.6, 114.9, 61.8, 56.1; MS (ESI): 321, 323 (M+H)<sup>+</sup>.

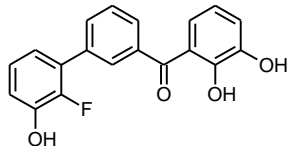
**(2,3-Dimethoxyphenyl)(2'-fluoro-3'-methoxybiphenyl-3-yl)methanone (3.29a).**



According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (3-bromophenyl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanone (**3.29b**) (161 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (102 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified

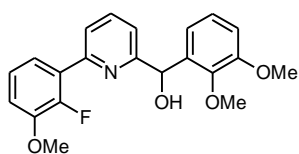
by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 163 mg (0.44 mmol, 89%) of the analytically pure compound. C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>FO<sub>4</sub>; MW: 366;  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.02-7.97 (m, 1H), 7.84 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 2.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.75 (ddd,  $J$  = 7.1 Hz, 2.7 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.52 (dt,  $J$  = 7.7 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.16-7.10 (m, 2H), 7.07-7.03 (m, 1H), 7.02-6.93 (m, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.73 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  196.2, 152.9, 152.2 (d,  $J$  = 250.9 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 11.3 Hz), 147.1, 138.0, 136.0, 134.2, 134.0 (d,  $J$  = 3.8 Hz), 130.5 (d,  $J$  = 2.8 Hz), 129.4, 129.0 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 128.6, 124.2 (d,  $J$  = 4.9 Hz), 124.1, 122.1 (d,  $J$  = 2.5 Hz), 120.6, 114.5, 112.7 (d,  $J$  = 1.9 Hz), 61.9, 56.5, 56.1; MS (ESI): 367 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2,3-Dihydroxyphenyl)(2'-fluoro-3'-hydroxybiphenyl-3-yl)methanone (3.29).**

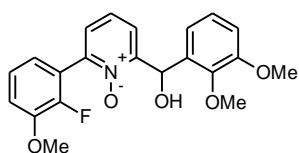


According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (2,3-dimethoxyphenyl)(2'-fluoro-3'-methoxybiphenyl-3-yl)methanone (**3.29a**) (110 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (4.5 ml, 4.5 mmol, 15 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was

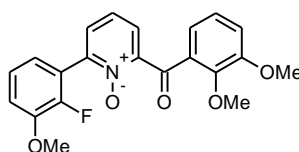
purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1, 3% acetic acid) to give 61 mg (0.19 mmol, 63%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>4</sub>; MW: 324; mp: 147-148 °C;  $^1\text{H}$  NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  11.90 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.92-7.88 (m, 1H), 7.88-7.83 (m, 1H), 7.79-7.74 (m, 1H); 7.69 (dt,  $J$  = 7.8 Hz, 4.6 Hz, 1H), 7.22-7.14 (m, 2H), 7.12 (dd,  $J$  = 7.6 Hz, 3.8 Hz, 1H), 7.09-6.99 (m, 2H), 6.85 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 4.8 Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  202.2, 151.8, 149.6 (d,  $J$  = 241.3 Hz), 147.4, 146.5 (d,  $J$  = 14.7 Hz), 139.1 (d,  $J$  = 1.0 Hz), 136.9, 133.3 (d,  $J$  = 4.0 Hz), 130.4 (d,  $J$  = 3.9 Hz), 129.6 (d,  $J$  = 12.0 Hz), 129.6 (d,  $J$  = 0.7 Hz), 129.3, 125.5 (d,  $J$  = 5.7 Hz), 124.7, 122.1 (d,  $J$  = 0.6 Hz), 121.6 (d,  $J$  = 2.6 Hz), 120.5 (d,  $J$  = 1.1 Hz), 119.7 (d,  $J$  = 0.8 Hz), 118.3 (d,  $J$  = 3.6 Hz); IR: 3434, 1630, 1451, 1324, 1281, 1234, 1196, 1166, 749 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 325 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 12.73 min; peak area, 99.6%.

**(2,3-Dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanol (3.30c).**


According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of (6-bromopyridin-2-yl)(2,3-dimethoxyphenyl)methanol (**3.11c**) (259 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (163 mg, 0.96 mmol, 1.2 eq) in DME/water (7.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1  $\rightarrow$  1:1) to give 272 mg (0.74 mmol, 92%) of the analytically pure compound.  $C_{21}H_{20}FNO_4$ ; MW: 369;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.70-7.64 (m, 2H), 7.58 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.7 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.27-7.23 (m, 1H), 7.21 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.04 (ddd,  $J$  = 9.5 Hz, 7.1 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.02 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 6.84 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.95 (s, 3H); 3.91 (s, 3H), 3.88 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  160.6, 152.7, 150.9 (d,  $J$  = 2.0 Hz), 150.7 (d,  $J$  = 250.6 Hz), 148.4 (d,  $J$  = 12.8 Hz), 146.6, 137.7, 137.1, 124.5, 124.1 (d,  $J$  = 5.0 Hz), 123.3 (d,  $J$  = 9.5 Hz), 122.1 (d,  $J$  = 2.2 Hz), 120.5, 119.7, 113.8 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 111.7, 69.0, 61.1, 56.6, 55.9; MS (ESI): 370 (M+H) $^+$ .

**(2,3-Dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)oxidopyridin-2-yl]methanol (3.30b).**


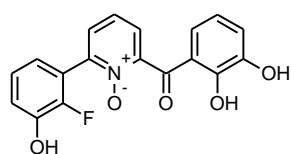
A solution of (2,3-dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]methanol (**3.30c**) (258 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq) in dry dichloromethane was cooled to 0  $^{\circ}C$  and *meta*-chloroperbenzoic acid (77%) (314 mg, 1.40 mmol, 2.0 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was diluted with dichloromethane, washed with 6 M KOH, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol 20:1) to give 178 mg (0.46 mmol, 66%) of the analytically pure compound.  $C_{21}H_{20}FNO_5$ , MW: 385;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.38 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.33 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.31 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.21 (dt,  $J$  = 7.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.18 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.16-7.07 (m, 2H), 6.99 (dd,  $J$  = 7.8 Hz, 2.1 Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.82 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  152.5, 150.1 (d,  $J$  = 250.9 Hz), 148.2 (d,  $J$  = 10.5 Hz), 146.2, 145.4, 132.5, 127.2 (d,  $J$  = 2.2 Hz), 124.9, 124.6, 124.2 (d,  $J$  = 5.0 Hz), 122.3 (d,  $J$  = 1.7 Hz), 119.8, 115.0 (d,  $J$  = 2.2 Hz), 112.4, 67.6, 60.8, 56.6, 55.9; MS (ESI): 386 (M+H) $^+$ .

**(2,3-Dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)oxidopyridin-2-yl]methanone (3.30a).**


According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (2,3-dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)oxidopyridin-2-yl]methanol (**3.30b**) (166 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (145 mg, 0.52 mmol, 1.2 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol 40:1  $\rightarrow$  20:1) to give 99 mg (0.26 mmol, 60%)

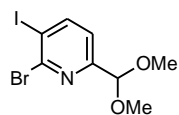
of the analytically pure compound. C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>FNO<sub>5</sub>; MW: 383; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.48 (ddd,  $J$  = 7.1 Hz, 2.5 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.48-7.43 (m, 2H), 7.41 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 7.2 Hz, 1H), 7.17-7.08 (m, 3H), 7.07-6.99 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.62 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  189.1, 152.3, 151.3, 149.6 (d,  $J$  = 152.5 Hz), 149.0, 148.2 (d,  $J$  = 10.7 Hz), 144.5, 131.3, 128.8 (d,  $J$  = 2.6 Hz), 125.3, 124.4, 124.2, 124.0 (d,  $J$  = 4.8 Hz), 122.5 (d,  $J$  = 1.6 Hz), 121.5, 120.8 (d,  $J$  = 11.8 Hz), 117.2, 114.7 (d,  $J$  = 2.5 Hz), 61.2 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 56.5, 56.1; MS (ESI): 384 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2,3-Dihydroxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)-oxidopyridin-2-yl]methanone (3.30).**



To a solution of (2,3-dimethoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)oxidopyridin-2-yl]methanone (**3.30a**) (99 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) in dry dichloromethane (3.0 ml), boron trifluoride dimethylsulfide complex (3.0 ml, 27 mmol, 105 eq) was slowly added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol 20:1  $\rightarrow$  15:1, 3% acetic acid) and preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 85:15:0.1  $\rightarrow$  5:95:0.1, in 160 min) to give 54 mg (0.16 mmol, 61%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>5</sub>; MW: 341; mp: 244 °C (decomposition); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  10.38 (bs, 1H), 9.99 (bs, 1H), 9.60 (bs, 1H), 7.69 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.55 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.13-7.02 (m, 3H), 6.98-6.88 (m, 2H), 6.74 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  191.5, 149.5, 148.9 (d,  $J$  = 246.2 Hz), 147.4, 146.2, 145.1 (d,  $J$  = 12.0 Hz), 144.7, 129.0, 125.6, 124.0, 124.2 (d,  $J$  = 4.4 Hz), 121.3, 121.2 (d,  $J$  = 12.3 Hz), 121.1, 120.9, 120.8, 119.2, 119.1 (d,  $J$  = 3.7 Hz); IR: 3086, 1637, 1470, 1388, 1349, 1255, 1231, 1201, 1177, 1134, 722, 658 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 342 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 3.38 min; peak area, 99.2%.

**2-Bromo-6-(dimethoxymethyl)-3-iodopyridine (3.31e).**

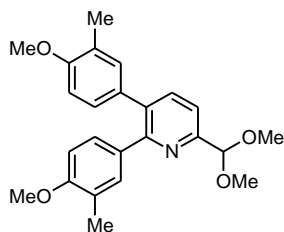


A 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexane (0.8 ml, 2.0 mmol, 1.0 eq) was added at -80 °C to a solution of diisopropylamine (0.31 ml, 2.2 mmol, 1.1 eq) in dry tetrahydrofuran (5.0 ml), under argon. The solution was allowed to warm up to -40 °C for 0.5 h. 2-Bromo-6-(dimethoxymethyl)pyridine (**3.31f**) (464 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) in dry tetrahydrofuran (2.0 ml) was added at -80 °C to the *in situ* prepared lithium diisopropylamide and the mixture was stirred at this temperature for 3 h. A solution of iodine (508 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) in dry tetrahydrofuran (1.0 ml) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature. The end of the reaction was monitored by TLC. The mixture was quenched with saturated ammonium chloride and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was



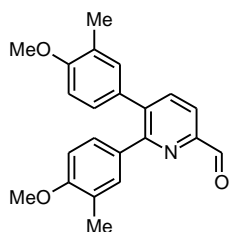
purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 171 mg (0.48 mmol, 24 %) of the analytically pure compound.  $C_8H_9BrINO_2$ ; MW: 358;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.13 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.24 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 5.25 (s, 1H), 3.40 (s, 6H).

**6-(Dimethoxymethyl)-2,3-bis(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine (3.31d).**

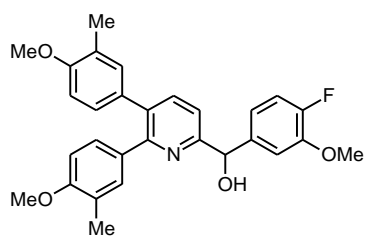


A mixture of 2-bromo-6-(dimethoxymethyl)-3-iodopyridine (3.31e) (170 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq), 4-methoxy-3-methylphenylboronic acid (199 mg, 1.2 mmol, 2.4 eq), cesium carbonate (1.30 g, 8.0 mmol, 4 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (23 mg, 0.02 mmol, 0.04 eq) was solved in DME/water (2:1, 6 ml) and degassed with argon. The mixture was heated to 80 °C and stirred overnight at 80 °C. The reaction mixture was cooled to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 202 mg (0.50 mmol, quant.) of the analytically pure compound.  $C_{24}H_{27}NO_4$ ; MW: 393;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.71 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.06 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.02-6.96 (m, 1H), 6.90 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 6.70 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.63 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 5.46 (bs, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.49 (s, 6H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H).

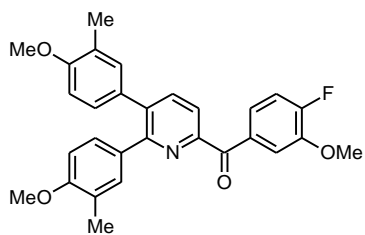
**5,6-Bis-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine-2-carbaldehyde (3.31c).**



6-(Dimethoxymethyl)-2,3-bis(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine (3.31d) (197 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) was stirred for 2 h in a mixture of water (1.5 ml) and acetic acid (1.0 ml) at 100 °C. The mixture was quenched with saturated sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 1:1) to give 149 mg (0.43 mmol, 86%) of the analytically pure compound.  $C_{22}H_{21}NO_3$ ; MW: 347;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  10.17 (s, 1H), 7.91 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.82 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.37-7.34 (m, 1H), 7.11 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.07-7.03 (m, 1H), 6.96 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.68 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.18 (s, 6H); MS (ESI): 348 (M+H) $^+$ .

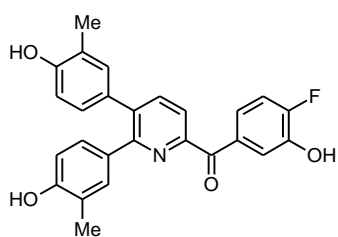
**(5,6-Bis-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanol (3.31b).**


According to **method 3.A2** the title compound was prepared by reaction of 4-bromo-1-fluoro-2-methoxybenzene (**3.23e**) (119 mg, 0.58 mmol, 1.0 eq), magnesium turnings (14 mg, 0.58 mmol, 1.0 eq) and 5,6-bis-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine-2-carbaldehyde (**3.31c**) (222 mg, 0.64 mmol, 1.1 eq). The crude product was used in the next step without further purification. C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>FNO<sub>4</sub>; MW: 474; **MS** (ESI): 474 (M+H)<sup>+</sup>.

**(5,6-Bis-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (3.31a).**


According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (5,6-bis-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanol (**3.31b**) (283 mg, 0.60 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (252 mg, 0.90 mmol, 1.5 eq) for 3 h. The crude product was purified by column chromatography

(cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 158 mg (0.34 mmol, 56 %) of the analytically pure compound. C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>FNO<sub>4</sub>; MW: 472; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.09 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 1.9 Hz, 1H), 8.01 (d,  $J$  = 7.93 Hz, 1H), 7.93 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.85 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.08-7.15 (m, 2H), 7.01 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 6.75 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.65 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.13 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  191.4, 157.9, 157.6, 157.4, 155.6 (d,  $J$  = 254.8 Hz), 155.5, 152.8, 152.8, 147.5 (d,  $J$  = 10.6 Hz), 139.7, 138.3, 133.2 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 132.3, 131.6, 129.0, 128.1, 127.0, 126.2, 126.1 (d,  $J$  = 7.7 Hz), 122.5, 116.3 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 115.5 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 109.9, 109.3, 56.4, 55.5, 55.4, 16.44, 16.41; **MS** (ESI): 472 (M+H)<sup>+</sup>.

**(5,6-Bis-(4-hydroxy-3-methylphenyl)pyridine-2-yl)(4-fluoro-3-hydroxyphenyl)methanone (3.31).**


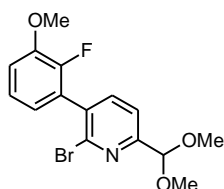
According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (5,6-bis-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.31a**) (145 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (4.5 ml, 4.5 mmol, 15 eq) in dichloromethane (6.0 ml).

The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) to give 100 mg (0.23 mmol, 76%) of the analytically pure compound. C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>4</sub>; MW: 429; **mp**: 112 °C (decomposition); **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.04 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.88-8.01 (m, 3H), 7.82 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.6 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.33 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 7.28 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.6 Hz, 1H), 7.11 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.05 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.2 Hz, 1H), 6.91 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.2 Hz, 1H), 6.79 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 6.66 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  191.9 (d,  $J$  = 1.0 Hz), 156.4, 156.3, 156.1, 155.3 (d,  $J$  = 249.3 Hz), 153.6, 145.4 (d,  $J$  = 13.3 Hz), 140.4, 139.0, 134.4 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 133.6,



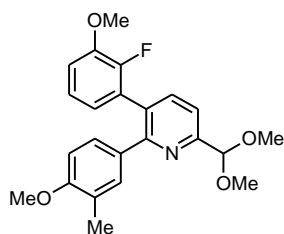
132.6, 132.1, 131.7, 129.6, 128.8, 125.4, 124.9 (d,  $J = 8.0$  Hz), 124.4, 122.6, 121.5 (d,  $J = 4.3$  Hz), 116.4 (d,  $J = 19.1$  Hz), 115.5, 114.6, 16.3, 16.2; **IR**: 3303, 1653, 1596, 1507, 1427, 1271, 1199, 1112, 762  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 430 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^{+}$ ; **HPLC** analysis: retention time = 13.23 min; peak area, 96.5%.

### 2-Bromo-6-(dimethoxymethyl)-3-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine (**3.32e**).

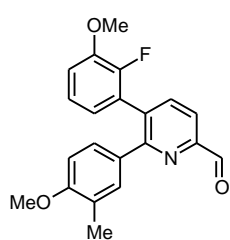


A mixture of 2-bromo-6-(dimethoxymethyl)-3-iodopyridine (**3.31e**) (201 mg, 0.56 mmol, 1.0 eq), 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (229 mg, 1.35 mmol, 2.4 eq), cesium carbonate (1.30 g, 8.0 mmol, 4 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (23 mg, 0.02 mmol, 0.04 eq) was solved in DME/water (2:1, 6.0 ml) and degassed with argon. The mixture was heated to 80 °C and stirred overnight at 80 °C under argon. The reaction mixture was cooled to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1) to give 168 mg (0.47 mmol, 84%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{BrFNO}_3$ ; MW: 356;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.66 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.60 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.15 (ddd,  $J = 8.2$  Hz, 7.8 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.05 (dt,  $J = 8.1$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.86 (ddd,  $J = 7.8$  Hz, 6.1 Hz, 1.6 Hz, 1H), 5.36 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.46 (s, 6H).

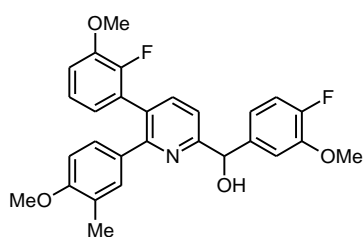
### 6-(Dimethoxymethyl)-3-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-2-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine (**3.32d**).



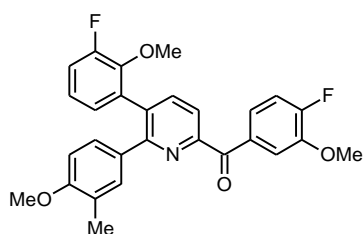
According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of 2-bromo-6-(dimethoxymethyl)-3-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine (**3.32e**) (168 mg, 0.47 mmol, 1.0 eq) with 4-methoxy-3-methylphenylboronic acid (94 mg, 0.57 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 183 mg (0.46 mmol, 81%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{FNO}_4$ ; MW: 397;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.73 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.11 (dd,  $J = 8.5$  Hz, 2.2 Hz, 1H), 6.98 (dt,  $J = 7.8$  Hz, 1.1 Hz, 1H), 6.90 (dt,  $J = 8.2$  Hz, 1.7 Hz, 1H), 6.54-6.72 (m, 3H), 5.47 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.50 (s, 6H), 2.11 (s, 3H).

**5-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)-6-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine-2-carbaldehyde (3.32c).**


6-(Dimethoxymethyl)-3-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-2-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine (**3.32d**) (173 mg, 0.44 mmol, 1.0 eq) was refluxed for 2 h in a mixture of water (6.0 ml) and acetic acid (4.0 ml). The mixture was quenched with saturated sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was used in the next step without further purification. C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>FNO<sub>3</sub>; MW: 351; **MS** (ESI): 352 (M+H)<sup>+</sup>.

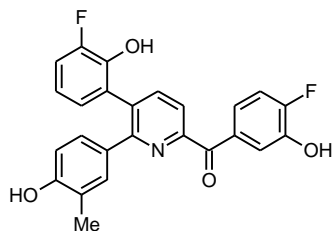
**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-6-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine-2-yl]methanol (3.32b).**


According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 4-bromo-1-fluoro-2-methoxybenzene (**3.23e**) (89 mg, 0.44 mmol, 1.0 eq) and 5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-6-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridine-2-carbaldehyde (**3.32c**) (153 mg, 0.44 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1  $\rightarrow$  5:1  $\rightarrow$  2:1) to give 75 mg (0.16 mmol, 36%) of the title compound. C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>; MW: 478; **MS** (ESI): 478 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-6-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.32a).**


According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-6-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanol (**3.32b**) (75 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (66 mg, 0.24 mmol, 1.5 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1) to give 54 mg (0.11 mmol, 73%) of the analytically pure compound. C<sub>28</sub>H<sub>23</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>; MW: 475; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.09 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.88 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.21-7.14 (m, 2H), 7.08-7.02 (m, 1H), 6.96 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 6.77 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 6.3 Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.64 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 2.10 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  191.3, 158.2, 156.4, 155.7 (d,  $J$  = 255.1 Hz), 154.1, 149.5 (d,  $J$  = 247.4 Hz), 148.2 (d,  $J$  = 11.1 Hz), 147.5 (d,  $J$  = 9.5 Hz), 140.5 (d,  $J$  = 1.6 Hz), 133.0 (d,  $J$  = 3.7 Hz), 132.0, 131.7, 131.4, 128.4 (d,  $J$  = 12.8 Hz), 128.2, 126.1 (d,  $J$  = 7.9 Hz), 124.2 (d,  $J$  = 5.0 Hz), 122.8 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 122.0, 116.3 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 115.6 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 113.3, 109.3, 56.5, 56.4, 55.4, 16.4; **MS** (ESI): 476 (M+H)<sup>+</sup>.

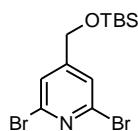
**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)-6-(4-hydroxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone (3.32).**



According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-6-(4-methoxy-3-methylphenyl)pyridin-2-yl]methanone (**3.32a**) (54 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.7 ml, 1.70 mmol, 15 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column

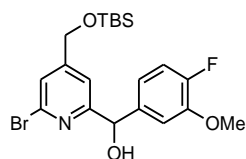
chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 34 mg (0.08 mmol, 69%) of the analytically pure compound.  $C_{25}H_{17}F_2NO_4$ ; MW: 433; **mp**: 145-146 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9.07 (bs, 1H), 8.70 (bs, 1H), 8.43 (bs, 1H), 8.00-7.96 (m, 2H), 7.94 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.81 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.33-7.27 (m, 2H), 7.10-6.99 (m, 3H), 6.83 (ddd,  $J$  = 7.5 Hz, 6.3 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.66 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.0 (d,  $J$  = 1.0 Hz), 157.1, 156.7, 155.4 (d,  $J$  = 249.2 Hz), 155.0, 149.2 (d,  $J$  = 241.5 Hz), 146.2 (d,  $J$  = 13.4 Hz), 145.5 (d,  $J$  = 13.2 Hz), 141.3 (d,  $J$  = 1.4 Hz), 134.2 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 132.9, 132.8, 131.8 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 129.4 (d,  $J$  = 13.1 Hz), 125.5 (d,  $J$  = 4.7 Hz), 124.9 (d,  $J$  = 7.7 Hz), 124.5, 122.4 (d,  $J$  = 1.9 Hz), 122.2, 121.4 (d,  $J$  = 4.3 Hz), 118.5 (d,  $J$  = 3.0 Hz), 116.6 (d,  $J$  = 19.2 Hz), 114.8, 16.2; **IR**: 3313, 2961, 2929, 2855, 1653, 1610, 1596, 1509, 1475, 1430, 1317, 1280, 1263, 1201, 1110, 1095, 818, 803, 778, 762  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 434 ( $M+H$ ) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 12.46 min; peak area, 95.5%.

**4-(((*tert*-Butyl(dimethyl)silyl)oxy)methyl)-2,6-dibromopyridine (3.33d).**



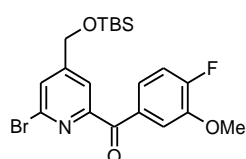
A mixture of (2,6-dibromopyridin-4-yl)methanol (**3.33e**) (534 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq), *tert*-butyldimethylsilyl chloride (392 mg, 2.6 mmol, 1.3 eq) and imidazole (340 mg, 5.0 mmol, 2.5 eq) was dissolved in dry dimethylformamide (2.0 ml). The reaction mixture was stirred for 18 h under argon atmosphere. The mixture was diluted with water and extracted with *n*-pentane. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1) to give 614 mg (1.6 mmol, 81%) of the analytically pure compound.  $C_{12}H_{19}Br_2NOSi$ ; MW: 381;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.40 (t,  $J$  = 0.8 Hz, 2H), 4.68 (t,  $J$  = 0.9 Hz, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.12 (s, 6H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  156.3, 140.8, 124.1, 62.6, 26.0, 18.4, 5.3; **MS** (ESI): 380, 382, 384 ( $M+H$ ) $^+$ .

**[6-Bromo-4-(((*tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy)methyl))pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl) methanol (3.33c).**



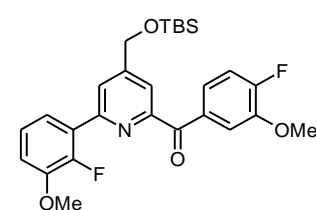
According to **method 3.A1** the title compound was prepared by reaction of 4-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy)methyl]-2,6-dibromopyridine (**3.33d**) (600 mg, 1.57 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (**3.33e**) (242 mg, 1.57 mmol, 1.0 eq). The crude product was used in the next step without further purification.  $C_{20}H_{27}BrFNO_3Si$ ; MW: 456; **MS** (ESI): 456, 458 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

**[6-Bromo-4-(((*tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy)methyl))pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl) methanone (3.33b).**



According to **method 3.B** the title compound was prepared by reaction of [6-bromo-4-(((*tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy)methyl))pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanol (**3.33c**) with 2-iodoxybenzoic acid (661 mg, 2.36 mmol, 1.5 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1) to give 520 mg (1.14 mmol, 73%, two steps) of the analytically pure compound.  $C_{20}H_{25}BrFNO_3Si$ ; MW: 454; **<sup>1</sup>H NMR** ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.93-7.87 (m, 2H), 7.76 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.69 (dd,  $J$  = 2.2 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 4.82-4.78 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 0.97 (s, 9H), 0.14 (s, 6H); **<sup>13</sup>C NMR** ( $CDCl_3$ ): 190.0 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 155.9 (d,  $J$  = 256.2 Hz), 155.3, 155.3, 147.7 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 141.0, 132.2 ( $J$  = 3.7 Hz), 127.7, 125.9 ( $J$  = 8.2 Hz), 120.9, 115.9 (d,  $J$  = 7.1 Hz), 115.8 (d,  $J$  = 8.5 Hz), 63.1, 56.4, 26.0, 18.5, -5.3; **MS** (ESI): 454, 456 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

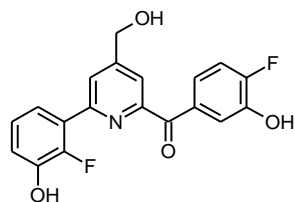
**[(4-(((*tert*-Butyl(dimethyl)silyl)oxy)methyl))-6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (3.33a).**



According to **method 3.C1** the title compound was prepared by reaction of [6-bromo-4-(((*tert*-butyl(dimethyl)silyl)oxy)methyl))pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.33b**) (227 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (102 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 8:1) to give 195 mg (0.39 mmol, 78%) of the analytically pure compound.  $C_{27}H_{31}F_2NO_4Si$ ; MW: 500; **<sup>1</sup>H NMR** ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.01-7.98 (m, 1H), 7.98-7.93 (m, 2H), 7.84 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (ddd,  $J$  = 8.2 Hz, 6.6 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.19-7.12 (m, 2H), 7.03 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 0.97 (s, 9H), 0.15 (s, 6H); **<sup>13</sup>C NMR** ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.9 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 155.7 (d,  $J$  = 255.3 Hz), 154.7, 153.0, 152.3 (d,  $J$  = 2.2 Hz), 150.9 (d,  $J$  = 250.8 Hz), 148.5 (d,  $J$  = 11.4 Hz), 147.6 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 132.9 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 127.7 (d,  $J$  = 10.2 Hz), 126.0 (d,  $J$  = 7.9 Hz), 124.2 (d,  $J$  = 5.0 Hz),

124.0 (d,  $J = 9.7$  Hz), 122.1 (d,  $J = 2.1$  Hz), 120.6, 115.9 (d,  $J = 3.5$  Hz), 115.6 (d,  $J = 18.9$  Hz), 113.9 (d,  $J = 2.4$  Hz), 63.8, 56.6, 56.4, 26.0, 18.5, -5.2; **MS** (ESI): 500 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)-4-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl]methanone (3.33).**



According to **method 3.E** the title compound was prepared by reaction of [(4-(((tert-butyl(dimethyl)silyl)oxy)methyl))-6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl](4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**3.33a**) (184 mg,

0.37 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (5.5 ml, 5.5 mmol, 15 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 4:3) to give 91 mg (0.26 mmol, 70%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>; MW: 357; **mp**: 225-226 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.04 (s, 1H), 8.83 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 8.07-8.02 (m, 1H), 8.00-7.95 (m, 1H), 7.85 (dd,  $J = 8.7$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.75 (ddd,  $J = 8.5$  Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.42 (ddd,  $J = 7.4$  Hz, 6.4 Hz, 2.9 Hz, 1H), 7.26 (dd,  $J = 10.8$  Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.14-7.06 (m, 1H), 4.90 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.79 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  192.4 (d,  $J = 1.2$  Hz), 155.9, 155.4 (d,  $J = 249.4$  Hz), 154.9, 153.1 (d,  $J = 2.2$  Hz), 150.7 (d,  $J = 245.0$  Hz), 146.4 (d,  $J = 13.8$  Hz), 145.5 (d,  $J = 13.2$  Hz), 134.2 (d,  $J = 3.4$  Hz), 128.7 (d,  $J = 9.2$  Hz), 125.2 (d,  $J = 4.7$  Hz), 124.9 (d,  $J = 7.7$  Hz), 124.6 (d,  $J = 9.1$  Hz), 122.0 (d,  $J = 1.7$  Hz), 121.2 (d,  $J = 4.3$  Hz), 121.1, 119.2 (d,  $J = 4.2$  Hz), 116.5 (d,  $J = 19.2$  Hz), 63.2; **IR**: 3390, 1651, 1599, 1483, 1441, 1429, 1407, 1301, 1235, 1195 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 358 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 7.64 min; peak area, 97.6%.

### 3.10.2 Biological Methods

#### Fluorimetric 17 $\beta$ -HSD14 Inhibition Assay

The potential inhibitor (in DMSO, final DMSO concentration in assay: 1%) was added to a mixture of NAD<sup>+</sup> (1.2 mM) and E2 (32  $\mu$ M) in 100 mM phosphate buffer pH 8. The enzymatic reaction was started by addition of the purified enzyme (1 mg/ml) and the production of the fluorescent NADH formed was measured continuously for 15 min at 25°C. The fluorimetric assays were recorded on a Tecan Sapphire 2 ( $\lambda_{\text{ex}}$  at 340 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  at 496 nm). The slit width for excitation was 7 nm and for emission 15 nm. Reactions were performed in 200  $\mu$ L volumes. The assay was run in 96 well-plates in duplicate, each experiment resulting from three technical repeats. A linear relationship between product formation and reaction time was obtained. The slope of the progress curves was calculated by linear regression. The inhibitors do not show fluorescence at the concentrations used in the assay.

The  $K_i$  values were calculated using the MORRISON equation (3.1).<sup>19</sup> For calculation, three constants were necessary: the substrate concentration (32  $\mu$ M), the  $K_m$  for 17 $\beta$ -HSD14 with this substrate E2

(6.18 μM<sup>26</sup>) and the concentration in active protein, which was determined experimentally for each experiment (3.2 or 3.3 μM), using the procedure detailed by COPELAND.<sup>19</sup> The fitting and data analysis was performed using GraphPad Prism 7.

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_i^{app}) - \sqrt{([E] + [I] + K_i^{app})^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \quad (3.1)$$

$v_i$ : initial rate observed in the presence of the inhibitor;  $v_0$ : initial rate observed in the absence of the inhibitor;  $[E]$ : total concentration of the enzyme;  $[I]$  total concentration of the inhibitor;  $K_i^{app}$ : apparent inhibition constant at the used substrate concentration.

$$K_i^{app} = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (3.2)$$

$K_i$ : inhibition constant;  $[S]$ : total concentration of the substrate;  $K_m$ : Michaelis constant.

### Solubility Assay

The solubility of the biologically evaluated compounds was tested in Phosphate-Buffered Saline (PBS, pH 7.4) at various inhibitor concentrations (3.13-200 μM, final DMSO concentration 2%). Clarity of the solutions was estimated optically after 0, 1, 2 and 24 h.

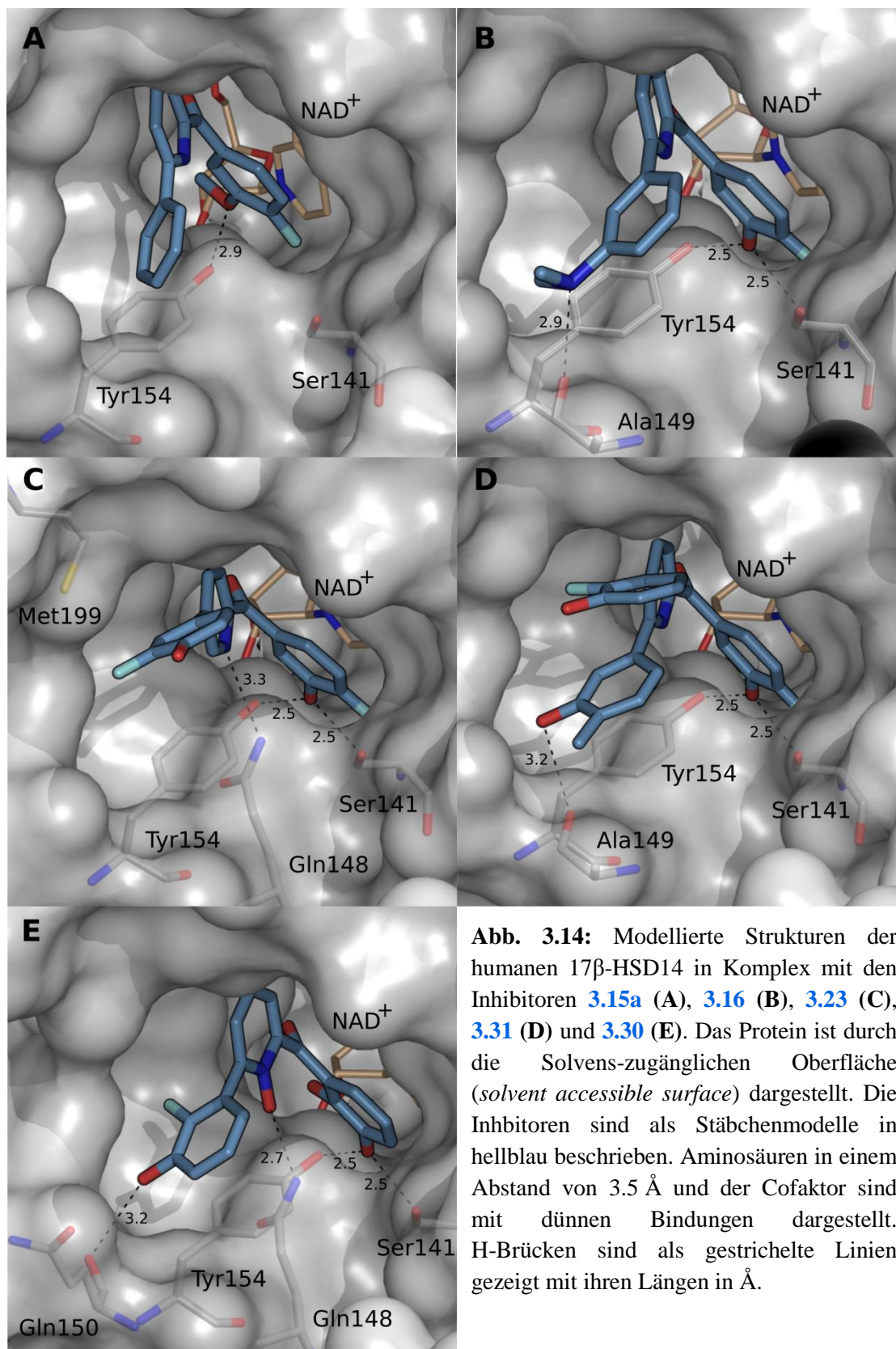
### Further Experimental Procedures

The descriptions of the enzyme expression and purification, the radioactive assays for 17β-HSD types 14, 1 and 2 and the co-crystallization experiments can be found in the original literature.<sup>27</sup>



### 3.11 Appendix

MOE Modelle der Verbindungen [3.15a](#), [3.16](#), [3.23](#), [3.30](#) und [3.31](#)



**Abb. 3.14:** Modellierte Strukturen der humanen 17 $\beta$ -HSD14 in Komplex mit den Inhibitoren [3.15a](#) (A), [3.16](#) (B), [3.23](#) (C), [3.31](#) (D) und [3.30](#) (E). Das Protein ist durch die Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) dargestellt. Die Inhibitoren sind als Stäbchenmodelle in hellblau beschrieben. Aminosäuren in einem Abstand von 3.5 Å und der Cofaktor sind mit dünnen Bindungen dargestellt. H-Brücken sind als gestrichelte Linien gezeigt mit ihren Längen in Å.

Tabelle 3.9: Physikochemische Parameter der Inhibitoren

Verbindungen	MW <sup>a</sup>	clog <i>P</i> <sup>a</sup>	cp <i>K</i> <sub>a</sub> <sup>b</sup>	tPSA <sup>a</sup>	Löslichkeit	Rotations- bindungen <sup>a</sup>	H-Donor <sup>a</sup>	H-Akzeptor <sup>a</sup>
<b>3.6</b>	323	4.35	1.94(N) 7.76 (O/ C <sub>-ring</sub> ) 9.92 (O/A <sub>-ring</sub> )	70.42	100-200 $\mu$ M	3	2	4
<b>3.7</b>	327	3.86	1.82(N) 7.58 (O/C <sub>-ring</sub> ) 8.23 (O/A <sub>-ring</sub> )	70.42	100-200 $\mu$ M	3	2	4
<b>3.8</b>	327	3.83	0.78(N) 7.46 (O/C <sub>-ring</sub> ) 8.07 (O/A <sub>-ring</sub> )	70.42	$\geq$ 200 $\mu$ M	3	2	4
<b>3.9</b>	343	3.54	0.69 (N) 6.30(2-O/C <sub>-ring</sub> ) 10.83(3-O/C <sub>-ring</sub> ) 7.76(O/A <sub>-ring</sub> )	90.65	$\geq$ 200 $\mu$ M	3	3	5
<b>3.10</b>	345	3.93	0.67 (N) 6.95(O/C <sub>-ring</sub> ) 7.84(O/A <sub>-ring</sub> )	70.42	-	3	2	4
<b>3.11</b>	325	3.20	0.69 (N) 7.12(2-O/C <sub>-ring</sub> ) 11.84(3-O/C <sub>-ring</sub> ) 7.88(O/A <sub>-ring</sub> )	90.65	$\geq$ 200 $\mu$ M	3	3	5
<b>3.12</b>	309	3.90	0.70 (N) 6.95(O/C <sub>-ring</sub> ) 7.84(O/A <sub>-ring</sub> )	70.42	25-50 $\mu$ M	3	2	4
<b>3.13</b>	341	2.93	0.70 (N) 7.09(2-O/C <sub>-ring</sub> ) 12.94(3-O/C <sub>-ring</sub> ) 8.81(4-O/C <sub>-ring</sub> ) 7.83(O/A <sub>-ring</sub> )	110.88	$\geq$ 200 $\mu$ M	3	4	6
<b>3.14</b>	341	3.14	0.60 (N) 7.06(2-O/C <sub>-ring</sub> ) 13.57(3-O/C <sub>-ring</sub> ) 8.52(4-O/C <sub>-ring</sub> ) 7.78(O/A <sub>-ring</sub> )	110.88	$\geq$ 200 $\mu$ M	3	6	4
<b>3.15a</b>	307	4.26	1.82 (N)	39.20	< 3,13 $\mu$ M	4	0	3
<b>3.15</b>	293	3.99	1.82 (N) 7.76(O/C <sub>-ring</sub> )	50.19	25-50 $\mu$ M	3	1	3
<b>3.16</b>	336	4.06	1.41 (N) 7.76(O/C <sub>-ring</sub> ) 4.85(N/A <sub>-ring</sub> )	53.43	25-50 $\mu$ M	4	1	4
<b>3.17</b>	309	3.48	1.73 (N) 7.75(O/C <sub>-ring</sub> ) 9.24(O/A <sub>-ring</sub> )	70.42	100-200 $\mu$ M	3	2	4



Verbindung	MW <sup>a</sup>	clogP <sup>a</sup>	cpK <sub>a</sub> <sup>b</sup>	tPSA <sup>a</sup>	Löslichkeit	Rotations- bindungen <sup>a</sup>	H-Donor <sup>a</sup>	H-Akzeptor <sup>a</sup>
<b>3.18</b>	307	2.85	1.64 (N) 7.22(2-O/C <sub>-ring</sub> ) 11.84(3-O/C <sub>-ring</sub> ) 9.23(O/A <sub>-ring</sub> )	90.65	≥ 200 μM	3	3	5
<b>3.19</b>	311	4.15	1.88 (N) 7.76(O/C <sub>-ring</sub> )	50.19	< 3,13 μM	3	1	3
<b>3.20</b>	346	4.75	1.82 (N) 7.76(O/C <sub>-ring</sub> )	50.19	< 3,13 μM	3	1	3
<b>3.21</b>	325	3.02	1.85 (N) 7.71(O/C <sub>-ring</sub> ) 12.19(4-O/A <sub>-ring</sub> ) 8.74(3-O/A <sub>-ring</sub> )	90.65	≥ 200 μM	3	3	5
<b>3.22</b>	323	4.35	1.81 (N) 7.75(O/C <sub>-ring</sub> ) 9.59(O/A <sub>-ring</sub> )	70.42	50-100 μM	3	2	4
<b>3.23a</b>	335	4.48	2.03(N) 2.04(N)	48.43	< 3,13 μM	5	0	4
<b>3.23</b>	327	3.93	7.48 (O/C <sub>-ring</sub> ) 8.08 (O/A <sub>-ring</sub> )	70.42	100-200 μM	3	2	4
<b>3.24</b>	217	2.10	2.46(N) 7.76 (O/C <sub>-ring</sub> )	50,19	≥ 200 μM	2	1	3
<b>3.25</b>	299	3.57	1.54 (N) 7.76(O/C <sub>-ring</sub> )	50.19	6,25-12,5 μM	3	1	3
<b>3.26</b>	300	3.45	3.82 (N) 7.76(O/C <sub>-ring</sub> )	53.43	100-200 μM	3	1	4
<b>3.27</b>	315	2.43	2.54 (N) 6.72(O/C <sub>-ring</sub> ) 7.80(O/A <sub>-ring</sub> )	56.67	25-50 μM	3	1	5
<b>3.28</b>	309	4.19	7.76(O/C <sub>-ring</sub> ) 7.26(2-O/C <sub>-ring</sub> )	59.42	100-200 μM	4	1	4
<b>3.29</b>	324	4.25	11.88(3-O/C <sub>-ring</sub> ) 8.05(O/A <sub>-ring</sub> ) 6.95(2-O/C <sub>-ring</sub> )	77.75	50-100 μM	3	3	4
<b>3.30</b>	341	1.57	11.77(3-O/C <sub>-ring</sub> ) 7.71(O/A <sub>-ring</sub> )	103.2	≥ 200 μM	3	3	6
<b>3.31</b>	429	6.46	1.68 (N) 7.75(O/C <sub>-ring</sub> ) 10.08(O/A <sub>-ring</sub> ) 9.45(O/D <sub>-ring</sub> )	90.65	100-200 μM	4	3	5
<b>3.32</b>	433	5.95	1.52 (N) 7.65(O/C <sub>-ring</sub> ) 9.87(O/A <sub>-ring</sub> ) 8.39(O/D <sub>-ring</sub> )	90.65	≥ 200 μM	4	3	5
<b>3.33</b>	357	3.51	0.69 (N) 7.46(O/C <sub>-ring</sub> ) 8.06(O/A <sub>-ring</sub> ) 14.60(O-CH <sub>2</sub> -)	90.65	≥ 200 μM	4	3	5

<sup>a</sup> berechnet mit Molinspiration<sup>23</sup>; <sup>b</sup> berechnet mit Marvin Sketch 15.9.14

### 3.12 Referenzen

- (1) Frotscher, M.; Ziegler, E.; Marchais-Oberwinkler, S.; Kruchten, P.; Neugebauer, A.; Fetzer, L.; Scherer, C.; Müller-Vieira, U.; Messinger, J.; Thole, H.; Hartmann, R. W. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of (Hydroxyphenyl)Naphthalene and -Quinoline Derivatives: Potent and Selective Nonsteroidal Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17 $\beta$ -HSD1) for the Treatment of Estrogen-Dependent Diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2158–2169.
- (2) Wetzel, M.; Marchais-Oberwinkler, S.; Hartmann, R. W. 17 $\beta$ -HSD2 Inhibitors for the Treatment of Osteoporosis: Identification of a Promising Scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 807–815.
- (3) Marchais-Oberwinkler, S.; Xu, K.; Wetzel, M.; Perspicace, E.; Negri, M.; Meyer, A.; Odermatt, A.; Möller, G.; Adamski, J.; Hartmann, R. W. Structural Optimization of 2,5-Thiophene Amides as Highly Potent and Selective 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Inhibitors for the Treatment of Osteoporosis. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 167–181.
- (4) Bey, E.; Marchais-Oberwinkler, S.; Negri, M.; Kruchten, P.; Oster, A.; Klein, T.; Spadaro, A.; Werth, R.; Frotscher, M.; Birk, B.; Hartmann, R. W. New Insights into the SAR and Binding Modes of Bis(Hydroxyphenyl)Thiophenes and -Benzenes: Influence of Additional Substituents on 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17 $\beta$ -HSD1) Inhibitory Activity and Selectivity. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6724–6743.
- (5) Wetzel, M.; Gargano, E. M.; Hinsberger, S.; Marchais-Oberwinkler, S.; Hartmann, R. W. Discovery of a New Class of Bicyclic Substituted Hydroxyphenylmethanones as 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 (17 $\beta$ -HSD2) Inhibitors for the Treatment of Osteoporosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 1–17.
- (6) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- (7) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- (8) Cai, D.; Hughes, D. L.; Verhoeven, T. R. A Study of the Lithiation of 2,6-Dibromopyridine with Butyllithium, and Its Application to Synthesis of L-739,010. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2537–2540.
- (9) Amb, C. M.; Rasmussen, S. C. 6,6'-Dibromo-4,4'-Di(Hexoxymethyl)-2,2'-Bipyridine: A New Solubilizing Building Block for Macromolecular and Supramolecular Applications. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4696–4699.

- (10) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, 97, 2457–2483.
- (11) Castro, A.; Depew, K.; Grogan, M.; Holson, E.; Hopkins, B.; Johannes, C.; Keaney, G.; Koney, N.; Liu, T.; Mann, D.; Nevalainen, M.; Peluso, S.; Perez, L.; Snyder, D.; Tibbitts, T. Compounds and Methods for Inhibiting the Interaction of Bcl Proteins with Binding Partners. WO2008024337 (A2), February 28, 2008.
- (12) Eckelbarger, J.; Epp, J.; Fischer, L.; Lowe, C.; Petkus, J.; Roth, J.; Satchivi, N.; Schmitzer, P.; Siddall, T. 4-Amino-6-(Heterocyclic)Picolinates and 6-Amino-2-(Heterocyclic)Pyrimidine-4-Carboxylates and Their Use as Herbicides. WO2014151008 (A1), September 25, 2014.
- (13) Bolliger, J. L.; Oberholzer, M.; Frech, C. M. Access to 2-Aminopyridines – Compounds of Great Biological and Chemical Significance. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 945–954.
- (14) Maiti, D.; Buchwald, S. L. Cu-Catalyzed Arylation of Phenols: Synthesis of Sterically Hindered and Heteroaryl Diaryl Ethers. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 1791–1794.
- (15) Baeyer, A.; Villiger, V. Einwirkung Des Caro'schen Reagens Auf Ketone. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, 32, 3625–3633.
- (16) Duan, X.-F.; Li, X.-H.; Li, F.-Y.; Huang, C.-H. A Concise Synthesis of 2,4-Disubstituted Pyridines: A Convenient Synthesis of 2-Bromo-4-Iodopyridine via Halogen Dance and Its Successive One-Pot Disubstitutions. *Synthesis* **2004**, 2004, 2614–2616.
- (17) Morrison, J. F. The Slow-Binding and Slow, Tight-Binding Inhibition of Enzyme-Catalysed Reactions. *Trends Biochem. Sci.* **1982**, 7, 102–105.
- (18) Morrison, J. F. Kinetics of the Reversible Inhibition of Enzyme-Catalysed Reactions by Tight-Binding Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, 185, 269–286.
- (19) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, 2000.
- (20) Baell, J. B.; Holloway, G. A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2719–2740.
- (21) [http://cbligand.org/PAINS/search\\_struct.php](http://cbligand.org/PAINS/search_struct.php).
- (22) Schweigert, N.; Zehnder, A. J. B.; Eggen, R. I. L. Chemical Properties of Catechols and Their Molecular Modes of Toxic Action in Cells, from Microorganisms to Mammals. *Environ. Microbiol.* **2001**, 3, 81–91.
- (23) <http://www.molinspiration.com>.
- (24) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRx* **2005**, 2, 541–553.
- (25) Lukacik, P.; Keller, B.; Bunkoczi, G.; Kavanagh, K. L.; Kavanagh, K.; Lee, W. H.; Hwa Lee, W.; Adamski, J.; Oppermann, U. Structural and Biochemical Characterization of Human

- Orphan DHRS10 Reveals a Novel Cytosolic Enzyme with Steroid Dehydrogenase Activity. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 419–427.
- (26) Bertoletti, N.; Braun, F.; Lepage, M.; Möller, G.; Adamski, J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. New Insights into Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14: First Crystal Structures in Complex with a Steroidal Ligand and with a Potent Nonsteroidal Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6961–6967.
- (27) Braun, F.; Bertoletti, N.; Möller, G.; Adamski, J.; Steinmetzer, T.; Salah, M.; Abdelsamie, A. S.; van Koppen, C. J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. First Structure–Activity Relationship of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14 Nonsteroidal Inhibitors and Crystal Structures in Complex with the Enzyme. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10719–10737.
- (28) *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.x Schrödinger, LLC.*
- (29) Powell, A. J.; Read, J. A.; Banfield, M. J.; Gunn-Moore, F.; Yan, S. D.; Lustbader, J.; Stern, A. R.; Stern, D. M.; Brady, R. L. Recognition of Structurally Diverse Substrates by Type II 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (HADH II)/Amyloid- $\beta$  Binding Alcohol Dehydrogenase (ABAD)1. *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 311–327.
- (30) Eisenberg, D.; Schwarz, E.; Komaromy, M.; Wall, R. Analysis of Membrane and Surface Protein Sequences with the Hydrophobic Moment Plot. *J. Mol. Biol.* **1984**, *179* (1), 125–142.
- (31) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of *Coot*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
- (32) Kruchten, P.; Werth, R.; Marchais-Oberwinkler, S.; Frotscher, M.; Hartmann, R. W. Development of a Biological Screening System for the Evaluation of Highly Active and Selective 17 $\beta$ -HSD1-Inhibitors as Potential Therapeutic Agents. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *301*, 154–157.
- (33) Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. Relationship between the Inhibition Constant (KI) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- (34) Kruchten, P. Entwicklung Eines Screeningsystems Zur Identifizierung Hochaktiver Und Selektiver Hemmstoffe Der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (17 $\beta$ HSD1). Dissertation, Universität des Saarlands: Saarbrücken, 2009.
- (35) Hwang, C.-C.; Chang, Y.-H.; Hsu, C.-N.; Hsu, H.-H.; Li, C.-W.; Pon, H.-I. Mechanistic Roles of Ser-114, Tyr-155, and Lys-159 in 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Carbonyl Reductase from *Comamonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3522–3528.
- (36) Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061–5084.
- (37) Michiels, P. J. A.; Ludwig, C.; Stephan, M.; Fischer, C.; Möller, G.; Messinger, J.; van Dongen, M.; Thole, H.; Adamski, J.; Günther, U. L. Ligand-Based NMR Spectra Demonstrate

- an Additional Phytoestrogen Binding Site for 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *117*, 93–98.
- (38) Perspicace, E.; Giorgio, A.; Carotti, A.; Marchais-Oberwinkler, S.; Hartmann, R. W. Novel N-Methylsulfonamide and Retro-N-Methylsulfonamide Derivatives as 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 (17 $\beta$ -HSD2) Inhibitors with Good ADME-Related Physicochemical Parameters. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 201–215.
- (39) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- (40) Andrus, M. B.; Meredith, E. L.; Sekhar, B. B. V. S. Synthesis of the Left-Hand Portion of Geldanamycin Using an Anti Glycolate Aldol Reaction. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 259–262.
- (41) Hicks, R. G.; Koivisto, B. D.; Lemaire, M. T. Synthesis of Multitopic Verdazyl Radical Ligands. Paramagnetic Supramolecular Synthons. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1887–1890.

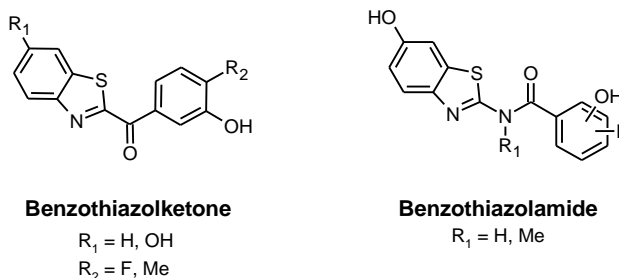


# Benzothiazolketone und –amide als Leitstrukturen zur Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren

# 4

## 4.1 Einleitung

In **Kapitel 3** wurde beschrieben, wie ausgehend von verschiedenen 17 $\beta$ -HSD1 und -2 Inhibitoren, die Klasse der Pyridinketone als Leitstrukturen zur Entwicklung von potentiellen Hemmstoffen für den Subtypen 14 diene. Neben den in der vorangegangenen Studie untersuchten Verbindungen, die von der AG R. W. HARTMANN (Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt wurden, haben sich zwei weitere Verbindungsklassen als interessant erwiesen. Dabei handelt es sich um Liganden mit einem Benzothiazolketon- bzw. einem Benzothiazolamid-Grundgerüst (**Abb. 4.1**).



**Abb. 4.1:** Getestete Benzothiazolketone und –amide auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14.

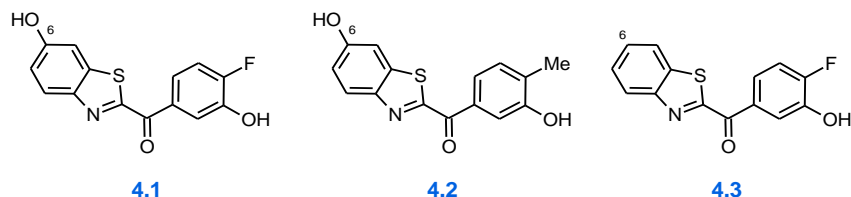
Während die ersten untersuchten Vertreter der Benzothiazolketonklasse bereits eine sehr hohe Bindungsaffinität zu 17 $\beta$ -HSD14 aufweisen, kann für diese besonders zum Subtypen 1 eine ausgeprägte inhibitorische Aktivität beobachtet werden. Das Ziel sollte es sein, durch Substitutionen am Grundgerüst dieser Klasse einen Gewinn an Selektivität zum Target herbeizuführen (siehe **Abschnitt 4.2**).

Ähnliche Beobachtungen können für die Klasse der Benzothiazolamide gemacht werden. Hier ist allerdings nach der Alkylierung der Amide eine Erhöhung der Selektivität zu 17 $\beta$ -HSD1 zu beobachten. Dies galt es bei der Weiterentwicklung dieser Strukturklasse zu berücksichtigen (siehe **Abschnitt 4.7**).

## 4.2 Design von Benzothiazolketonen

In einer vorangegangenen Studie wurden 17 $\beta$ -HSD1 und -2 Inhibitoren auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 untersucht. Neben den in **Kapitel 3** beschriebene Strukturklassen (dort **A-E**), wurden ebenfalls die Verbindungen **4.1-4.3** der Benzothiazolketonklasse untersucht (**Tabelle 4.1**). Danach kann für den Inhibitor **4.1** bereits eine sehr hohe Affinität gegenüber dem Target (68% Inhibition bei 1  $\mu$ M) beschrieben werden. Allerdings ist nur eine geringe Selektivität gegenüber den Subtypen 1 und 2 zu beobachten ( $IC_{50}$  = 13 nM bzw. 121 nM).<sup>1</sup> Der Vergleich dieser Verbindung mit **4.2** (keine Inhibition bei 1  $\mu$ M) macht deutlich, dass auch in dieser Verbindungsklasse das 3-OH/4-F Substitutionsmuster am Phenylring essentiell für eine gute Bindung zum Target 17 $\beta$ -HSD14 ist. Dies kann als ein Indiz für einen vergleichbaren Bindungsmodus gewertet werden, wie er in **Kapitel 3** für die Pyridinketone beschrieben wurde. Der Verlust der 6-OH Gruppe am Benzothiazolring resultiert für Verbindung **4.3** in einem Affinitätsverlust zu 17 $\beta$ -HSD14 (**4.1**: 68% Inhibition vs. **4.3**: 84% Inhibition bei 1  $\mu$ M) und führt ebenfalls zu einem leichten Selektivitätsvorteil gegenüber dem Subtypen 1 ( $IC_{50}$  = 13 nM vs. 136 nM). SPADARO *et al.* berichteten jedoch von einer geringen Selektivität von Vertretern mit einer 6-OH Gruppe in dieser Klasse der Benzothiazolketone gegenüber den Estrogenrezeptoren (ERs).<sup>1</sup> Eine Aussage für Verbindungen ohne diesen Substituenten am Benzothiazolring, wie **4.3**, konnte jedoch nicht getroffen werden (**Tabelle 4.1**). Daher sollte zusammen mit dem Fokus auf die Selektivität gegenüber den Subtypen 1 und 2 bei der weiteren Inhibitoroptimierung auch die Selektivität gegenüber den ERs berücksichtigt werden, die ausgehend von Verbindung **4.3** durchgeführt wurde.

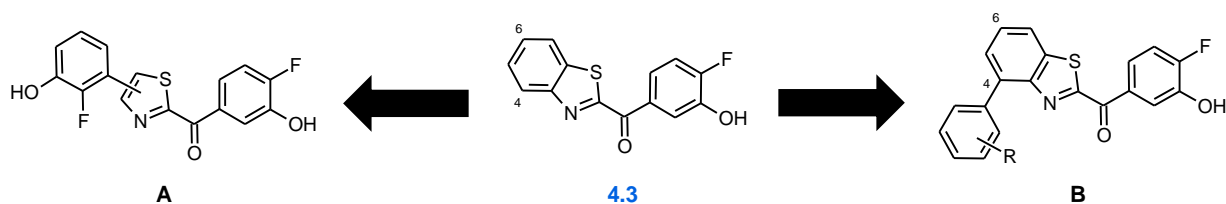


**Tabelle 4.1:** Interessante Benzothiazolketone aus der vorangegangenen Studie.


Verb.	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 1 $\mu$ M) <sup>a</sup>	17 $\beta$ -HSD1 IC <sub>50</sub> (nM) <sup>1</sup>	17 $\beta$ -HSD2 IC <sub>50</sub> (nM) <sup>1</sup>	ER $\alpha$ RBA (%)	ER $\beta$ RBA (%)
4.1	68	13	121	0.1-1	0.1-1
4.2	k.i.	27	4003	<0.1	<0.1
4.3	84	136	104	n.b.	n.b.

<sup>a</sup> Rekombinantes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, bakterielle Suspension, Substrat [<sup>3</sup>H]-E2 [18.3 nM], NAD<sup>+</sup> [7.5 mM], Mittelwert aus drei Messungen; Standardabweichung < 10%; k.i.: keine Inhibition, n.b.: nicht bestimmt, RBA: relative Bindungsaffinität.

In einem ersten Ansatz (**A**) sollte der Benzothiazolring der Leitstruktur **4.3** zu einem Thiazolkern vereinfacht werden, der einen substituierten Phenylring tragen sollte. In der AG R. W. HARTMANN wurden bereits Thiazolketone auf ihren Einsatz als 17 $\beta$ -HSD1 Inhibitoren hin untersucht. Im Rahmen einer Struktur-Aktivitätsbeziehung für den Subtypen 14 wurden hier die Vertreter **4.4-4.6**<sup>2</sup> dieser Klasse herangezogen (siehe **Tabelle 4.2**). Zusätzlich sollten Verbindungen mit einem zum Inhibitor **3.8** analogen Substitutionsmuster synthetisiert werden, um einen direkten Vergleich mit dieser zu ermöglichen. Ebenfalls galt es das Fehlen des A-Rings zu untersuchen, sodass die Darstellung der Verbindungen **4.7-4.9** (siehe **Tabelle 4.2**) das Ziel dieser Studie war (**Abb. 4.2**).

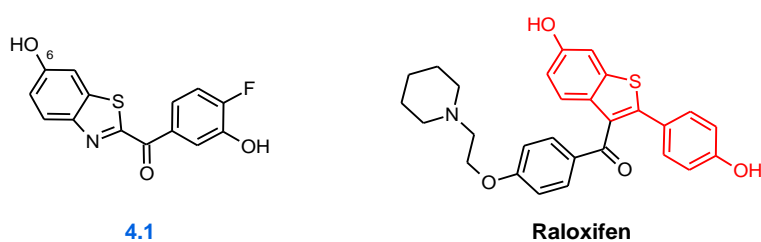

**Abb. 4.2:** Geplante Modifikationen ausgehend von Verbindung **4.3**.

In einem zweiten Ansatz wurde das Benzothiazolketonmotiv als Kernstruktur beibehalten und das Substitutionsmuster am Phenylring untersucht. Hierzu wurden die Verbindungen **4.10** und **4.11**<sup>1</sup> (siehe **Tabelle 4.3**) herangezogen, die ebenfalls von der AG R. W. HARTMANN zur Verfügung gestellt wurden.

Für die angesprochene Optimierung der Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 sollte ausgehend von Verbindung **4.3** ein substituierter Phenylring in Position 4 des Benzothiazolrings eingefügt werden (**B**). Dadurch wurde eine größere Raumauffüllung der Struktur **B** angestrebt. Da vor allem für diesen

HSD Subtypen eine relativ begrenzte aktive Tasche bekannt ist,<sup>3</sup> sollten sterisch anspruchsvolle Inhibitoren zu einem Selektivitätsvorteil führen (siehe **Abb. 4.2**). Durch die Entfernung der 6-OH Gruppe am Benzothiazolring wurde neben einem Affinitätsgewinn gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 (vgl. **4.2**, **Tabelle 4.1**) ein unterschiedlicher Pharmakophor im Vergleich zu dem nichtsteroidalen, selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) Raloxifen angestrebt. Hierdurch sollte eine Steigerung der Selektivität gegenüber den ERs ermöglicht werden. Aus diesen Überlegungen resultierte Verbindung **4.2** (siehe **Tabelle 4.3**). Das eingeführte 3-OH Phenylmotiv dieses Wirkstoffkandidaten sollte zusätzliche H-Brücken mit dem Protein ermöglichen und eine ausreichende Löslichkeit gewährleisten.

In **Abb. 4.3** ist die strukturelle Ähnlichkeit des in rot dargestellten Bausteins von Raloxifen und der Dihydroxyverbindung **4.1** veranschaulicht.

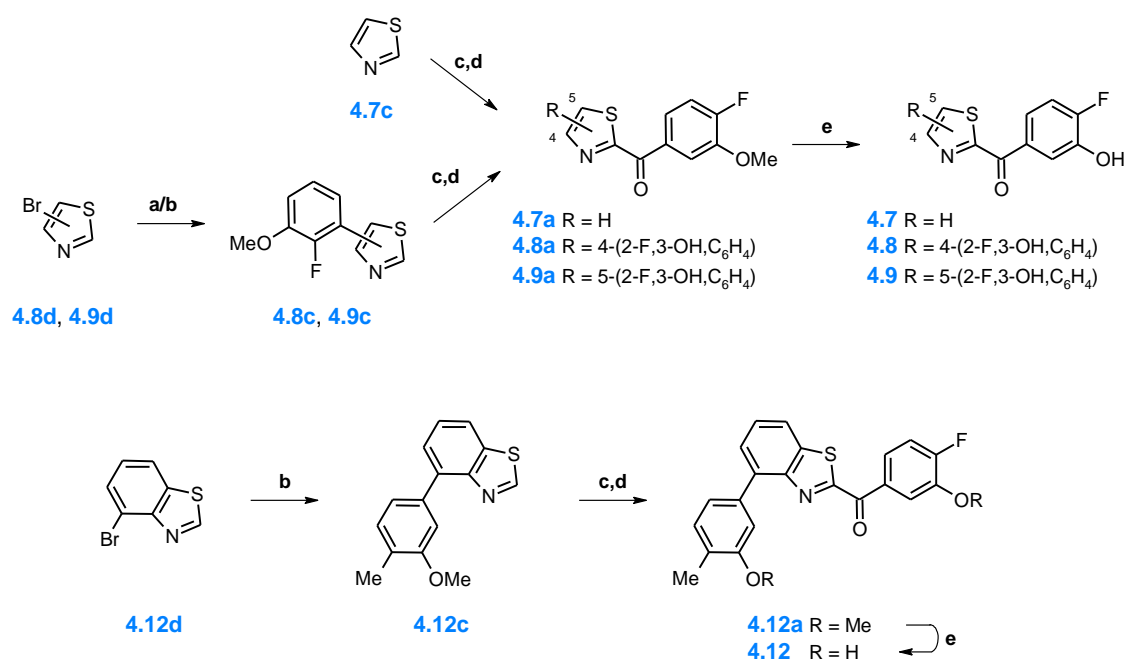


**Abb. 4.3:** Vergleich der Strukturen von **4.1** und Raloxifen.

## 4.3 Synthese

Die Synthese der Verbindungen **4.7-4.9** und **4.12** erfolgte in 3 bis 4 Schritten ausgehend von den Thiazolen **4.7c**, **4.8d** und **4.9d** bzw. 4-Bromobenzothiazol (**4.12d**). Die Verbindungen **4.8d**, **4.9d** und **4.12d** wurden in einer SUZUKI-MIYaura-Reaktion<sup>4</sup> mit 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure umgesetzt, um die Verbindungen **4.8c**, **4.9c** und **4.12c** in guten bis sehr guten Ausbeuten (76-89%) zu erhalten. Diese drei Verbindungen, als auch 1,3-Thiazol **4.7c**, wurden mit *n*-BuLi lithiiert und in einer nukleophilen Addition mit 4-Fluor-3-methoxybenzaldehyd umgesetzt. Die gebildeten Alkohole (nicht veranschaulicht) wurden mit IBX zu den entsprechenden Ketonen **4.7a-4.9a** und **4.12a** oxidiert. Dabei konnten über zwei Stufen ebenfalls gute bis sehr gute Ergebnisse erzielt werden (38-53% Ausbeute). Die Spaltung der Methoxyfunktionen mit BBr<sub>3</sub> lieferte die Verbindungen **4.7-4.9** und **4.12** (**Schema 4.1**) mit sehr guten Ausbeuten von 79-86%.

**Schema 4.1:** Darstellung der Verbindungen **4.7-4.9** und **4.12**.



Bedingungen: **a)** für **4.8c**: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure, DME/H<sub>2</sub>O (2:1),  $\mu$ W, 150 W, 150 °C, 1 h; **b)** für **4.9c** und **4.12c**: Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure, DME/H<sub>2</sub>O (2:1), 80 °C, über Nacht; **c)** *n*-BuLi, THF<sub>abs.</sub>, -80 °C  $\rightarrow$  RT; **d)** IBX, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C; **e)** BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht.

## 4.4 Löslichkeit und biologische Ergebnisse

### 4.4.1 Löslichkeit

Der Löslichkeitsbereich der meisten Verbindungen wurde nach der in **Kapitel 3** beschriebenen Methode bestimmt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der analysierten Inhibitoren in 100 mM Phosphatpuffer (pH = 7.4) gemischt und die eventuelle Bildung von Niederschlägen nach 0, 1, 2 und 24 h kontrolliert. Für die Thiazole **4.4-4.7** kann ein gutes bis sehr gutes Löslichkeitsverhalten unter den gewählten Bedingungen beobachtet werden (~100  $\mu$ M). Die Analoga zu Verbindung **3.8**, **4.8** und **4.9**, weisen hingegen eine deutlich geringere Löslichkeit auf (25-50 bzw. 6.3-12.5  $\mu$ M, **Tabelle 4.2**). Für das Benzothiazolketon **4.1** kann ebenfalls ein gutes Lösungsverhalten bestimmt werden (100-200  $\mu$ M), wohingegen die Entfernung der 6-OH Gruppe die Löslichkeit von Verbindung **4.3** einschränkt und vergleichbar zu der von Verbindung **4.12** wird (~25  $\mu$ M, **Tabelle 4.3**).

### 4.4.2 17 $\beta$ -HSD14 Inhibition

Um die inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen beurteilen zu können, wurde ein Fluoreszenzassay durchgeführt wie er bereits in **Kapitel 3** ausführlich beschrieben wurde. Die Resultate sind als prozentuale Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 2  $\mu$ M angegeben. Die Inhibitionskonstante  $K_i$  wurde für die interessantesten Verbindungen experimentell bei zehn Konzentrationen zwischen 260 nM und 10  $\mu$ M bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der quadratischen Gleichung nach MORRISON für „tight binding inhibitors“,<sup>5</sup> da auf Grund einer ähnlichen Inhibitor- und Proteinkonzentration keine klassische Kinetik<sup>6,7</sup> vorlag (vgl. **Kapitel 3**).

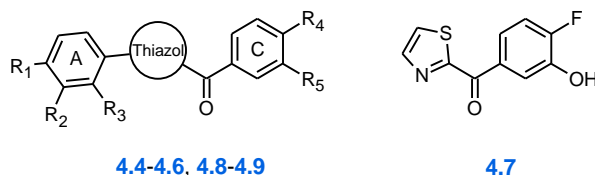
#### Thiazolketone

Neben den dargestellten Verbindungen **4.7-4.9** wurden zusätzlich die Verbindungen **4.4-4.6**<sup>2</sup> auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 untersucht um eine systematische Struktur-Wirkungsbeziehung aufstellen zu können. Diese Verbindungen wurden ebenfalls in der AG R. W. HARTMANN (Universität des Saarlandes) entwickelt und freundlicherweise für Testzwecke zur Verfügung gestellt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Tabelle 4.2** zusammengefasst.

Die Inhibitoren **4.4-4.6** weisen unterschiedliche Orientierungen des Thiazolkerns auf, wobei die Substitutionsmuster am A- als auch am C-Ring identisch sind. Kein signifikanter Unterschied in der Potenz zu 17 $\beta$ -HSD14 kann für diese Verbindungen beobachtet werden (36-39% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Ferner kann festgestellt werden, dass der Verlust des A-Ring zu einer Inaktivierung der Verbindungen führt (**4.7**, keine Inhibition bei 1  $\mu$ M). Unter den getesteten Verbindungen stellen sich die Inhibitoren

**4.8** und **4.9** als potenteste Vertreter dieser Klasse heraus, wobei zwischen diesen kein signifikanter Affinitätsunterschied beobachtet werden kann ( $K_i$  = 60-70 nM; ~50% Inhibition bei 1  $\mu$ M).

**Tabelle 4.2:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) der Thiazolketone **4.4-4.9**.



Verb.	Kern	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>	Löslichkeit ( $\mu$ M)
<b>4.4</b>		OH	Me	H	H	OH	39	n.b.	100-200
<b>4.5</b>		OH	Me	H	H	OH	36	n.b.	>200
<b>4.6</b>		OH	Me	H	H	OH	38	n.b.	50-100
<b>4.7</b>		-	-	-	F	OH	k.i.	n.b.	>200
<b>4.8</b>		H	OH	F	F	OH	50	69 $\pm$ 9	25-50
<b>4.9</b>		H	OH	F	F	OH	47	63 $\pm$ 3	6.3-12.5

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25 °C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen. k.i.: keine Inhibition, n.b.: nicht bestimmt.

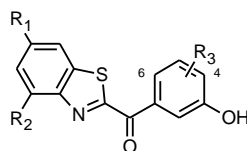
## Benzothiazolketone

Neben den im Designabschnitt verglichenen Verbindungen **4.1**, **4.2** und **4.3** wurde die inhibitorische Wirkung der literaturbekannten Benzothiazolketone **4.10** und **4.11**<sup>1</sup> sowie der neu synthetisierten Verbindung **4.12** gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 untersucht (**Tabelle 4.3**).

Für Verbindung **4.1** kann die in **Tabelle 4.1** beschriebene starke Affinität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 bestätigt werden ( $K_i$  = 73 nM). Wie schon für Verbindung **4.2** gezeigt, weisen die Inhibitoren **4.10** und **4.11** einen zum 3-OH/4-F Substitutionsmotiv abweichenden Phenylring auf. Dieser resultiert im Vergleich zu **4.1** in einer geringeren Bindung an das Target (**4.2**: keine Inhibition; **4.10**: 15% Inhibition; **4.11**: 32% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Dennoch kann für das 3,6-Dihydroxymotiv von Verbindung **4.11** eine geringe Aktivität beobachtet werden. Wie im Designabschnitt beschrieben, wurde der Hemmstoff **4.3** als Startpunkt zur Modifikation dieser Verbindungsklasse ausgewählt. Der Vergleich mit dem 6-OH Analogon **4.2** zeigt an dieser Stelle eine vergleichbare Affinität zu

17 $\beta$ -HSD14 (**4.2**:  $K_i$  = 88 nM vs. **4.1**:  $K_i$  = 73 nM). Die aus **4.3** entwickelte sterisch anspruchsvolle Verbindung **4.12** weist unter den getesteten Verbindungen die höchste Affinität zum Target auf ( $K_i$  = 17 nM).

**Tabelle 4.3:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von Benzothiazolketonen.



**4.1-4.3, 4.10-4.13**

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>	Löslichkeit ( $\mu$ M)
<b>4.1</b>	OH	-	4-F	47	73 $\pm$ 5	100-200
<b>4.2</b>	OH	-	4-Me	k.i.	n.b.	n.b.
<b>4.10</b>	OH	-	4-OPh	15	n.b.	n.b.
<b>4.11</b>	OH	-	6-OH	32	n.b.	n.b.
<b>4.3</b>	H	-	4-F	61	88 $\pm$ 19	25-50
<b>4.12</b>	H		4-F	65	17 $\pm$ 2	12.5-25

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25 °C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen. k.i.: keine Inhibition, n.b.: nicht bestimmt.

#### 4.4.3 Selektivität ausgewählter Verbindungen

Die dargestellten Inhibitoren sollten im weiteren Verlauf dieses Projekts als mögliche *tool compounds* zur Aufklärung der physiologischen Rolle von 17 $\beta$ -HSD14 nach deren *in vivo* Applikation dienen. Hierzu wurde angestrebt, dass diese Verbindungen eine hohe Selektivität gegenüber anderen 17 $\beta$ -HSDs aufweisen, um ihnen eindeutig einen pharmakologischen Effekt zuordnen zu können. Da die in diesem Kapitel beschriebenen Verbindungen aus einer Strukturbibliothek von 17 $\beta$ -HSD1 und -2 Inhibitoren hervorgingen, lag der Fokus zunächst auf der Selektivität gegenüber diesen beiden Subtypen. Wie zu Beginn dieses Kapitels beschrieben, kann für die Ausgangsverbindung **4.3** neben der guten Affinität zum Target ebenfalls eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber den Subtypen 1 und 2 beobachtet werden. Demnach war von hohem Interesse, ob für die Thiazole **4.8** und **4.9** das gute Selektivitätsprofil des Pyridinketonanalogons **3.8** (siehe **Kapitel 3**) erhalten, oder sogar verbessert werden konnte. Anhand von Verbindung **4.12** wurde untersucht, ob die sterische Erweiterung vor allem zu einem Selektivitätsvorteil gegenüber dem Subtypen 1 führt. In **Tabelle 4.4** sind die von

JANNINE LUDWIG (AK DUCHO, Universität des Saarlandes) bestimmten Selektivitätsdaten für die Inhibitoren **4.8**, **4.9** und **4.12** im Vergleich zu den Verbindungen **3.8** und **4.3** aufgeführt.

Ansatz (A): Im Vergleich zum Inhibitor **3.8** kann für die Thiazolanaloga **4.8** und **4.9** eine erhebliche Selektivitätseinbuße gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 beobachtet werden (8% vs. 59 bzw. 100 % Inhibition bei 1  $\mu$ M). Auffällig ist, dass die unterschiedliche Orientierung des Thiazolrings für Verbindung **4.9** in einer vollständigen Inhibition dieses Subtyps resultiert, während für Verbindung **4.8** eine Inhibition von 59 % unter den gewählten Bedingungen zu beobachten ist. In Bezug auf 17 $\beta$ -HSD2 kann für die Verbindungen **4.8** und **4.9** ebenfalls ein Selektivitätsverlust im Vergleich zum Pyridinderivat **3.8** festgestellt werden (**4.8**: 88%, **4.9**:100%, **3.8**: 56% Inhibition bei 1  $\mu$ M).

Ansatz (B): Für den Inhibitor **4.12** ist hingegen im Vergleich zur Ausgangsverbindung **4.3** eine schwächere Potenz gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 festzustellen (27% vs. 88% Inhibition bei 1  $\mu$ M), wobei eine ähnlich hohe inhibitorische Aktivität gegenüber dem Subtypen 2 ausgemacht werden kann (85% vs. 88% Inhibition bei 1  $\mu$ M).

**Tabelle 4.4:** Inhibitorische Aktivität der interessantesten Inhibitoren gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2.

Verb.	17 $\beta$ -HSD1 (% Inh. @ 1 $\mu$ M) <sup>a</sup>	17 $\beta$ -HSD2 (% Inh. @ 1 $\mu$ M) <sup>b</sup>
<b>3.8</b>	8	56
<b>4.4</b>	32	51
<b>4.5</b>	19	57
(A) <b>4.6</b>	IC <sub>50</sub> = 35 nM	IC <sub>50</sub> = 485 nM
<b>4.8</b>	59	88
<b>4.9</b>	100	100
<hr/>		
(B) <b>4.3</b>	88	85
<b>4.12</b>	27	88

<sup>a</sup> 17 $\beta$ -HSD1 Enzym (Plazenta), zytosolische Fraktion, radioaktiver Verdrängungsassay, Substrat [<sup>3</sup>H]-E1 + E1 [500 nM], NADH [0.5 mM], Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten; Standartabweichung < 20%. <sup>b</sup> 17 $\beta$ -HSD2 Enzym (Plazenta), mikrosomale Fraktion, radioaktiver Verdrängungsassay, Substrat [<sup>3</sup>H]-E2 + E2 [500 nM], NAD<sup>+</sup> [1.5 mM], Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten; Standartabweichung < 20%.

## 4.5 Diskussion der Ergebnisse

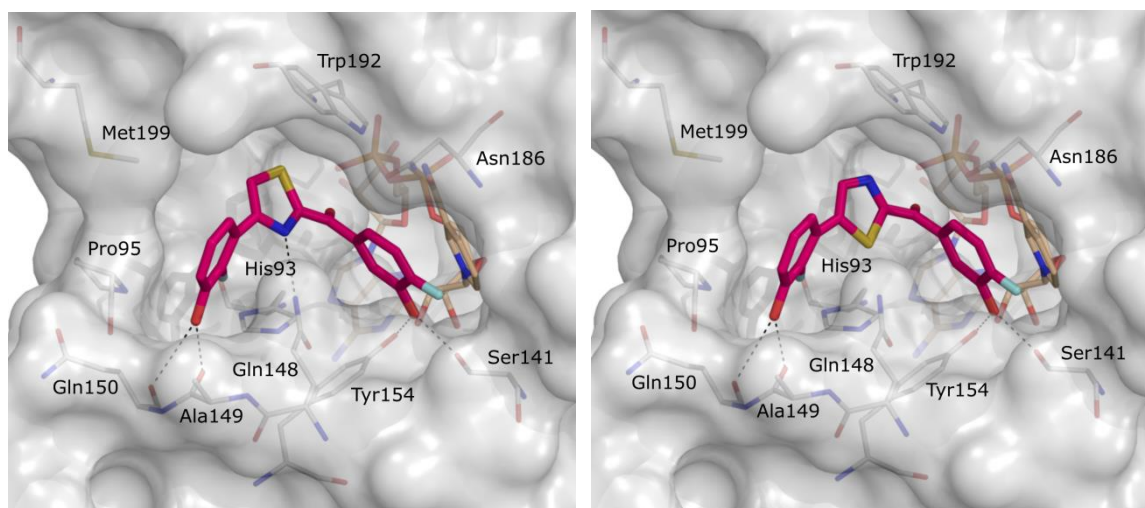
### 4.5.1 Thiazolketone

Während für die Verbindungen **4.4-4.6** eine gute bis sehr gute Löslichkeit zu beobachten ist, sinkt diese erheblich für die Inhibitoren **4.8** und **4.9**. Auffällig ist dabei ebenfalls, dass die unterschiedliche Orientierung des Thiazolrings für Verbindung **4.9** in einer schlechteren Löslichkeit im Vergleich zum Analogon **4.9** resultiert (**4.8**: 25-50  $\mu$ M vs. **4.9**: 6.25-12.5  $\mu$ M). Vor allem aber zeigen diese Verbindungen eine schlechtere Löslichkeit zur Referenz **3.8** (>200  $\mu$ M, **Tabelle 3.9**).

Obwohl die Thiazole **4.4**, **4.5** und **4.6** keine Fluorsubstituenten am C-Ring tragen, zeigen sie doch eine signifikante inhibitorische Wirkung (36-39% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Diese Verbindungen können aufgrund ihrer Substitutionsmuster am A- als auch am C-Ring mit der Pyridinverbindung **3.6** (vgl. **Kapitel 3**) verglichen werden. Auch für diese, als Leitstruktur beschriebene Verbindung, wurde bereits eine gute Bindung zu 17 $\beta$ -HSD14 beschrieben (34% Inhibition bei 1  $\mu$ M,  $K_i$  = 245 nM).<sup>3</sup>

Verbindungen **4.8** und **4.9** stellen die potentesten Thiazolketone dar, die auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 getestet wurden. Im Designabschnitt wurde die Wichtigkeit des 3-OH/4-F-Substitutionsmuster am C-Ring diskutiert. Diese diente als Indiz dafür, dass auch für diese Inhibitorenklasse ein ähnlicher Bindungsmodus wie für die Pyridinklasse aus **Kapitel 3** angenommen werden kann. Da keine Kristallstruktur von diesen Verbindungen erhalten werden konnte, wurden die Verbindungen **4.8** und **4.9** mit Hilfe von MOE<sup>8</sup> in das aktive Zentrum von 17 $\beta$ -HSD14 modelliert. Dabei wurde angenommen, dass auch bei den Thiazolketonen die 3-OH Gruppe am C-Ring H-Brücken zu den katalytischen Aminosäuren Ser141 und Tyr154 ausbildet. Es konnte beobachtet werden, dass beide Verbindungen auf diese Weise durchaus in die aktive Tasche des Targets binden können (**Abb. 4.4**). Die Orientierung des Thiazolkerns scheint sowohl beim Vergleich dieser beiden Verbindungen, als auch beim direkten Vergleich der Inhibitoren **4.4**, **4.5** und **4.6** keinen Einfluss auf die Bindung zum Enzym zu haben. Eine spezifische Interaktion der Heteroatome im Thiazolkern konnte auch in den modellierten Bindungsposen nicht beobachtet werden. Die Hydroxygruppe am A-Ring wäre für beide Strukturen in der Lage eine H-Brücke zu Ala149 auszubilden, wie sie auch für den Inhibitor **3.8** beobachtet wurde (vgl. **Kapitel 3**). Der leichte Verlust an Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 (**4.8**:  $K_i$  = 69 bzw. **4.9**:  $K_i$  = 63 nM vs. **3.8**:  $K_i$  = 13 nM) könnte durch leicht unterschiedlich starke Wechselwirkungen des Pyridinkerns im Vergleich zum Thiazolmotiv mit dem Protein erklärt werden, die im oberen Bereich der aktiven Tasche in einer hydrophoben Region lokalisiert sind. Die Entfernung des A-Rings und der damit einhergehende Verlust an weiteren möglichen Interaktionen mit dem Protein führt zu einem erheblichen Verlust an Affinität für Verbindung **4.7** wie es analog für das Pyridinderivat **3.24** (**Kapitel 3**) beschrieben wurde und hebt so die Wichtigkeit des A-Rings in Bezug auf eine gute Bindung zum Protein hervor.





**Abb. 4.4:** Modellerte Strukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit den Verbindungen **4.8** (links) und **4.9** (rechts). Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) in grau dargestellt. Die Inhibitoren sind als Stäbchenmodelle und ausgewählte Aminosäuren und der Cofaktor (NAD<sup>+</sup>) sind mit schmalen Bindungen abgebildet. Die Kohlenstoffatome der Inhibitoren sind in rot dargestellt. Mögliche H-Brücken sind als gestrichelte Linien veranschaulicht.

Bezüglich der Selektivität kann für die Verbindungen **4.8** und **4.9** im direkten Vergleich mit dem Pyridinketon **3.8** ein schlechteres Profil gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 ausgemacht werden (**4.8**: 59%; **4.9**: 100%; **3.8**: 8% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Die unterschiedliche Orientierung des Thiazolrings sorgt ebenfalls für eine unterschiedliche Affinität der Inhibitoren **4.8** und **4.9** zu diesem Subtypen. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von OSTER *et al.*,<sup>2</sup> die berichteten, dass ein Schwefelatom entscheidend für eine gute Bindung zu 17 $\beta$ -HSD1 ist. In dieser Studie wurde das Thiazolderivat **4.6** als hochpotenter Inhibitor dieses Enzyms beschrieben (IC<sub>50</sub> = 35 nM), wobei das analoge Thiophen eine noch höhere inhibitorische Aktivität aufweist (IC<sub>50</sub> = 8 nM). Beide Verbindungen weisen Substituenten in den Positionen 2 und 5 des Thiophen- bzw. Thiazolrings auf, sodass das Schwefelatom in direkter Nachbarschaft beider Substituenten eingebettet ist. Die weiteren Thiazolverbindungen **4.4** und **4.5**, mit unterschiedlich orientierten Kernbausteinen, weisen hingegen deutlich schlechtere Affinitäten (32% bzw. 19% Inhibition bei 1  $\mu$ M) zu diesem Subtypen auf. Um eine hohe Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 zu erzielen, erscheint es somit ratsam, auf ein Schwefelatom im Kernmotiv zu verzichten. Die Betrachtung der inhibitorischen Aktivität der Verbindungen **4.8** und **4.9** gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 offenbart ebenfalls eine schlechtere Selektivität im Vergleich zum Inhibitor **3.8** (**4.8**: 88%, **4.9**: 100%, **3.8**: 56% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Beim Vergleich von Inhibitor **4.8** mit Verbindung **4.4** lässt sich ein Trend feststellen, der auf die gleiche Orientierung des Thiazolrings zurückzuführen ist. So ist für beide Verbindungen die inhibitorische Aktivität gegenüber dem Subtypen 2 höher als gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 (**4.8**: 88% vs. 59% Inhibition; **4.4**: 51% vs. 32% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Wie zuvor für die Affinität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 beschrieben, ist die Position des Schwefelatoms im Thiazolring auch beim Subtypen 2 entscheidend für eine hohe Bindung zu

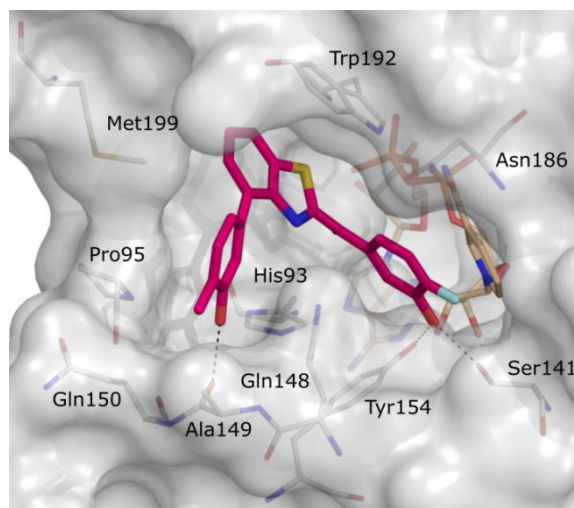
diesem Enzym. So ist die hohe inhibitorische Aktivität vom Inhibitor **4.9** nicht verwunderlich, wenn man Verbindung **4.6** im Vergleich betrachtet ( $IC_{50} = 485$  nM). Somit ist es auch im Bezug zu diesem 17 $\beta$ -HSD ratsam auf ein Schwefelatom im Kernmotiv zu verzichten.

#### 4.5.2 Benzothiazolketone

In der Klasse der Benzothiazolketone wurde auf die 6-OH Gruppe am Benzothiazolring verzichtet um die inhibitorische Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 zu erhöhen und um eine mögliche Interaktion mit den ERs zu vermeiden (siehe **Abschnitt 4.2.1**). Dies führt jedoch, wie beschrieben, zu einer geringeren Löslichkeit im wässrigen Medium. Bei der Optimierung dieser Inhibitoriklasse ist es somit zwingend notwendig auf die Löslichkeit der entworfenen Verbindungen zu achten.

Die Struktur-Wirkungsbeziehung, welche in **Kapitel 3** für die Pyridinklasse im Hinblick auf das Substitutionsmuster am C-Ring aufgestellt wurde, kann auch für die Benzothiazolketone übertragen werden und bestätigt die aufgestellte Korrelation. Von den untersuchten Verbindungen mit einer 6-OH Gruppe am Benzothiazolring zeigt **4.1** die stärkste Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 ( $K_i = 73$  nM). Wie auch die besten Inhibitoren der Pyridinklasse, weist es ein 3-OH/4-F Substitutionsmuster am C-Ring auf. Die Substitution des Fluoratoms durch eine Methylgruppe bzw. durch einen Phenylether resultiert in der inaktiven Verbindung **4.2** bzw. der schwach aktiven **4.10** (15% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Unter der Annahme eines analogen Bindungsmodus, wie er für die Pyridinketone beobachtet und für die Thiazolketone postuliert wurde, kann für diese Substituenten eine sterische Hinderung angenommen werden. Durch diese wäre es denkbar, dass die 3-OH Gruppe am C-Ring keine starke Wechselwirkungen mehr mit der katalytischen Triade ausbilden kann. Verbindung **4.11** weist hingegen an dieser Stelle ein Proton auf, was in einer moderaten Aktivität resultiert (32% Inhibition bei 1  $\mu$ M).

Die Eliminierung der 6-OH Gruppe am Benzothiazolring resultierte in Verbindung **4.3** ( $K_i = 88$  nM) mit einer zu **4.1** ( $K_i = 73$  nM) vergleichbaren Affinität zum Target. Eine spezifische Interaktion der OH Gruppe mit dem Protein ist daher eher unwahrscheinlich. Die Modifikation von Verbindung **4.3** führte zu Inhibitor **4.12**, für den ein Gewinn an Affinität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 ( $K_i = 17$  nM) festzustellen ist. Wie bereits für die Verbindungen **4.8** und **4.9** gezeigt, wurde auch für Inhibitor **4.12** versucht, durch eine modellierte Struktur eine Bindung in die aktive Tasche zu verifizieren. Es konnte beobachtet werden, dass der Ligand in der aktiven Tasche platzt findet, um mit den Aminosäuren Ser141 und Tyr154 der katalytischen Triade zu interagieren (**Abb. 4.5**). Wie auch in der Klasse der Pyridine könnte der Inhibitor eine „V-förmige Gestalt“ annehmen, um sich an die Substratbindetasche anzupassen. Am äußeren Ende der Tasche wäre es dem Inhibitor ebenfalls möglich eine H-Brücke mit der *backbone* Carbonylgruppe von Ala149 einzugehen. Somit wäre für **4.12** ein analoger Bindungsmodus möglich, wie er für Vertreter der Pyridinklasse beschrieben wurde (**Kapitel 3**).



**Abb. 4.5:** Modellierte Struktur von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit Verbindungen 4.12. Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) in grau dargestellt. Der Inhibitor ist als Stäbchenmodell und ausgewählte Aminosäuren und der Cofaktor (NAD<sup>+</sup>) sind mit schmalen Bindungen abgebildet. Die Kohlenstoffatome des Inhibitors sind in rot dargestellt. Mögliche H-Brücken sind als gestrichelte Linien veranschaulicht.

Bezüglich der Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 konnte gezeigt werden, dass ausgehend von der Startverbindung 4.3 (88% Inhibition bei 1  $\mu$ M) ein Gewinn an Selektivität durch die Vergrößerung des Liganden erzielt wird (4.12: 27% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Die ursprüngliche Annahme, dass größere Liganden einen Selektivitätsvorteil gegenüber diesem Subtypen haben, kann somit bestätigt werden. Eine erhöhte Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 ist allerdings nicht zu beobachten. Es ist anzunehmen, dass sich die aktiven Taschen der Isoformen 2 und 14 stark ähneln, in der das sterisch anspruchsvolle Strukturgerüst von Verbindung 4.12 Platz findet. Alternativ könnte der Einsatz dieser Verbindungen als dualer 17 $\beta$ -HSD2/17 $\beta$ -HSD14 Inhibitor in Betracht gezogen werden, um einen Effekt in Organen wie der Plazenta und der Leber, in denen beide Enzyme exprimiert werden, zu untersuchen.

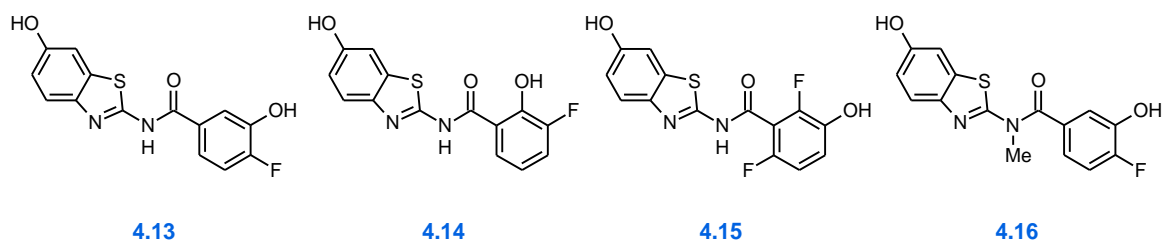
## 4.6 Fazit

In der Klasse der Thiazolketone lässt sich zusammenfassend feststellen, dass für die Verbindungen 4.8 und 4.9 keine Vorteile gegenüber dem Inhibitor 3.8 ermittelt werden konnten. Die leicht schlechtere Bindungsaffinität zu 17 $\beta$ -HSD14, die geringere Löslichkeit und das schlechtere Selektivitätsprofil gegenüber den Subtypen 1 und 2 zeigen, dass das Strukturmotiv dieser Verbindungen keine wirklich aussichtsreiche Alternative zum Pyridinketonmotiv darstellt.

Bei den Benzothiazolketonen kann Verbindung 4.12 als vielversprechender Ausgangspunkt für die Entwicklung alternativer 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren dienen. So ist dieser Ligand ein hochpotenter 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitor mit einer guten Selektivität gegenüber dem Subtypen 1. Eine noch weiter optimierte Ausfüllung der aktiven Tasche des Targets könnte diese Eigenschaften zusätzlich verstärken. Hierzu ist es jedoch erforderlich eine Kristallstruktur dieses Inhibitors im Komplex mit dem Subtypen 14 zu erhalten, um einen strukturbasierten Ansatz verfolgen zu können. Eine Erhöhung der Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 gestaltet sich schwierig da, wie in **Kapitel 3** beschrieben, keine Kristallstruktur von diesem Subtypen bekannt ist. Im weiteren Verlauf des Projektes sollte ebenfalls die Selektivität des Inhibitors 4.12 gegenüber den ERs bestimmt werden, um einen negativen Einfluss auf diese ausschließen zu können.

## 4.7 Design von Benzothiazolamiden

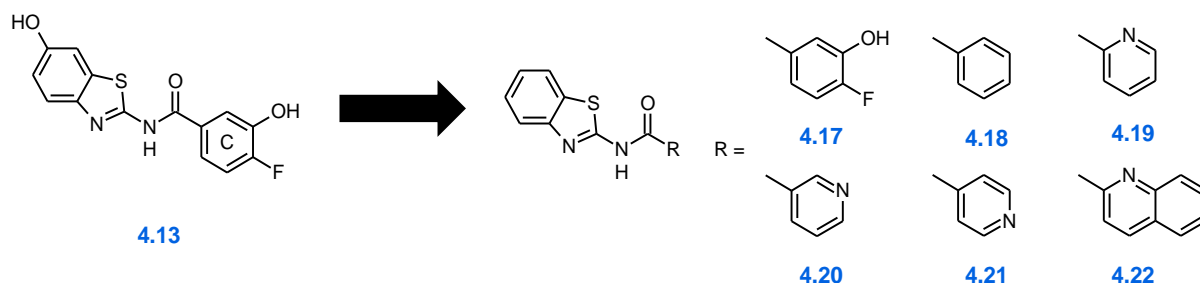
In der vorangegangenen Studie (vgl. **Kapitel 3**) wurden ebenfalls die Verbindungen **4.13-4.16** der Benzothiazolamidklasse untersucht (**Tabelle 4.5**). Dabei konnte das Amid **4.13** als erster vielversprechender 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitor identifiziert werden (51% Inhibition bei 1  $\mu$ M), der im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Benzothiazolketonen **4.1** und **4.3** (**Abschnitt 4.2**) einen zehnfachen Selektivitätsgewinn gegenüber dem Subtypen 2 liefert ( $IC_{50}$  = 1480 nM vs. 121 nM und 104 nM). Beim Vergleich von **4.13** mit der unter den gewählten Assaybedingungen inaktiven Verbindung **4.14**, kann auch in dieser Klasse die Wichtigkeit des 3-OH/4-F Substitutionsmusters am Phenylring hervorgehoben werden. Die Kombination einer 3-OH Gruppe mit Fluorsubstituenten in 2- und 6-Position am Phenylring resultierte in Verbindung **4.15** (44% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Der Vergleich mit **4.13** zeigt, dass zwei Fluoratome in *ortho*- und *para*-Position keine additiv positive Wirkung auf die Potenz des Inhibitors gegenüber dem Target hat. Allerdings resultiert daraus ein mehr als zehnfacher Selektivitätsverlust hinsichtlich des Subtypen 1. Durch die Methylierung des Amids **4.13** kann für Verbindung **4.16** ein weiterer Affinitätsgewinn gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 verzeichnet werden (78% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Zusätzlich hebt das relativ vielversprechende Selektivitätsprofil gegenüber den Subtypen 1 und 2 ( $IC_{50}$  = 2704 nM bzw. 667 nM) diesen Vertreter als möglichen Startpunkt für die weitere Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren hervor. Dennoch wurde neben **4.16** ebenfalls **4.13** als Startpunkt zur Entwicklung weiterer Verbindungen gewählt, um eine systematische Struktur-Wirkungsbeziehung aufstellen zu können.

**Tabelle 4.5:** Interessante Benzothiazolamide aus der vorangegangenen Studie.


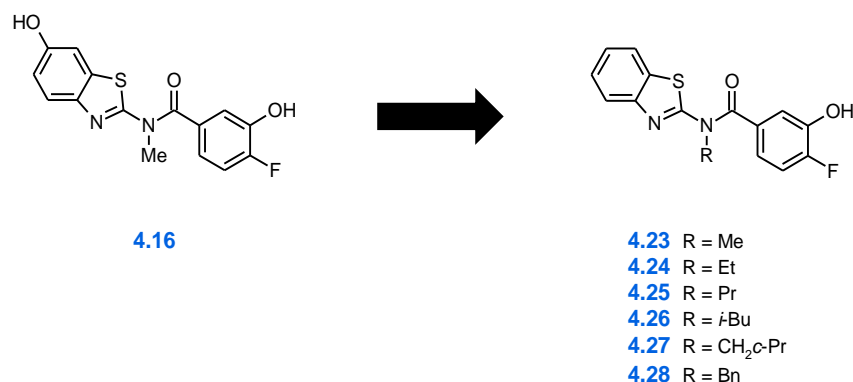
Verbindung	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 1 $\mu$ M) <sup>a</sup>	17 $\beta$ -HSD1 IC <sub>50</sub> (nM) <sup>1</sup>	17 $\beta$ -HSD2 IC <sub>50</sub> (nM) <sup>1</sup>
<b>4.13</b>	51	171	1480
<b>4.14</b>	k.i.	k.i.	k.i.
<b>4.15</b>	44	13	1774
<b>4.16</b>	78	2704	667

<sup>a</sup> Rekombinantes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, bakterielle Suspension, Substrat [<sup>3</sup>H]-E2 [18.3 nM], NAD<sup>+</sup> [7.5 mM], Mittelwert aus drei Messungen; Standardabweichung < 10%, k.i.: keine Inhibition.

Ausgehend von Verbindung **4.13** wurde, wie auch beim Design der Benzothiazolketone (**Abschnitt 4.2**), zunächst auf die 6-OH Gruppe am Benzothiazolring verzichtet. Dadurch sollte die Selektivität gegenüber den ERs gewährleistet werden, die von SPADARO *et al.* zwar für die dort getesteten Verbindungen dieser Klasse als gut beschrieben werden konnte,<sup>1</sup> aber durch die geringe Anzahl an vermessenen Inhibitoren nicht verallgemeinert werden sollte. Vielmehr war jedoch die Abkehr vom Pharmakophor der in der AG R. W. HARTMANN entworfenen Verbindungen das Ziel. Ferner wurden unterschiedliche aromatischen C-Ringe (R) eingefügt, um deren Auswirkungen auf die Aktivität zum Target als auch auf die Selektivität gegenüber den 17 $\beta$ -HSDs 1 und 2 zu untersuchen (**Abb. 4.6**).

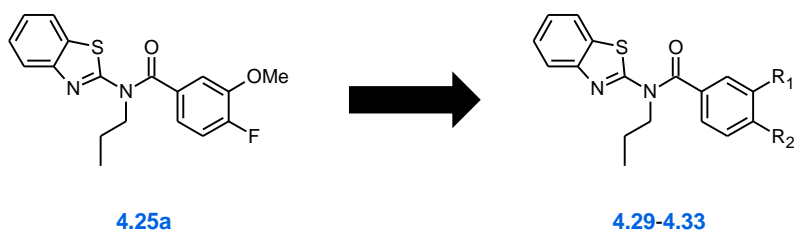

**Abb. 4.6:** Ausgehend von Verbindung **4.13** entworfene Verbindungen mit unterschiedlichen aromatischen C-Ringen.

Wie zuvor beschrieben, resultiert die Methylierung der zentralen Amidfunktion von **4.13** zunächst in einer erhöhten inhibitorischen Wirkung für Verbindung **4.16** gegenüber 17 $\beta$ -HSD14. Zum einen kann angenommen werden, dass die Amidgruppe durch die Alkylierung mehr Rotationsfreiheiten gewinnt, und sich so besser an die aktive Tasche des Targets anpasst. Grundlage für diese Annahme ist der Energieunterschied zwischen der *cis*- und *trans*-Anordnung um die Amidbindung und dass gegebenenfalls die Isomerisierungsbarriere reduziert wird. Zum anderen ist zu vermuten, dass die Methylgruppe hydrophobe Kontakte in der Bindetasche eingeht und der Desolvationsaufwand für die methylierte Aminogruppe geringer als für die freie Aminogruppe ausfällt. Daher sollten zum Erstellen einer Struktur-Wirkungsbeziehung unterschiedliche Seitenketten an die Amidgruppe angefügt werden. Zusätzlich sollte ebenfalls auf die 6-OH Gruppe am Benzothiazolring verzichtet werden was in den entworfenen Verbindungen **4.23-4.28** resultierte (Abb. 4.7).



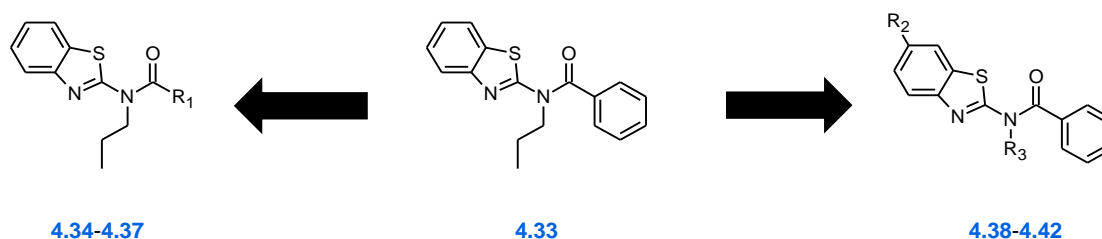
**Abb. 4.7:** Ausgehend von Verbindung **4.16** entworfene Verbindungen mit unterschiedlichen Seitenketten.

Im Verlauf der Untersuchung der dargestellten Verbindungen bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität, stellte sich Verbindung **4.25a** als eine der interessantesten Inhibitoren dieser Klasse heraus. Diese trägt eine Propylseitenkette und ein 3-OMe/4-F Motiv am Phenylring. Aufbauend auf diesem Gerüst wurden erneut verschiedene Substituenten am C-Ring eingeführt, wobei die Propylseitenkette beibehalten werden sollte. Demnach wurde die Synthese der Verbindungen **4.29-4.33** angestrebt (Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6:** Ausgehend von Verbindung **4.25a** entworfene Verbindungen.


Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>4.29</b>	H	OMe
<b>4.30</b>	OMe	H
<b>4.31</b>	F	H
<b>4.32</b>	H	F
<b>4.33</b>	H	H

Aufgrund einer auffallend geringen Löslichkeit der in **Tabelle 4.6** vorgestellten Verbindungen (vgl. **Abschnitt 4.3.3**), wurde das Amid **4.33** für die Entwicklung weiterer potentieller Inhibitoren ausgewählt. Um ein besseres Löslichkeitsverhalten in wässrigen Medien gewährleisten zu können, erfolgte der Austausch des Phenylrings der Verbindung **4.33** durch unterschiedlich verknüpfte Pyridine (**4.34-4.36**), als auch durch einen Chinolylsubstituenten (**4.37**). Aus diesen sollte es nach Bedarf möglich gewesen sein gut lösliche Salze bilden zu können. Ferner wurde die Wiedereinführung einer Hydroxygruppe (**4.38**) und die Funktionalisierung mit einer Aminogruppe in Position 6 des Benzothiazolrings (**4.39**) angestrebt. Ebenfalls sollte der Austausch der Propylseitenkette gegen polare Substituenten wie ein Methylamid und ein Ethylamin (**4.40** und **4.41**) eine verbesserte Löslichkeit gewährleisten (**Tabelle 4.7**).

**Tabelle 4.7:** Ausgehend von Verbindung **4.33** entworfene Verbindungen.


Verb.	R <sub>1</sub>
<b>4.34</b>	Pyridin-2-yl
<b>4.35</b>	Pyridin-3-yl
<b>4.36</b>	Pyridin-4-yl
<b>4.37</b>	Chinolin-2-yl

Verb.	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>4.38</b>	OH	Pr
<b>4.39</b>	NH <sub>2</sub>	Pr
<b>4.40</b>	H	CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
<b>4.41</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>

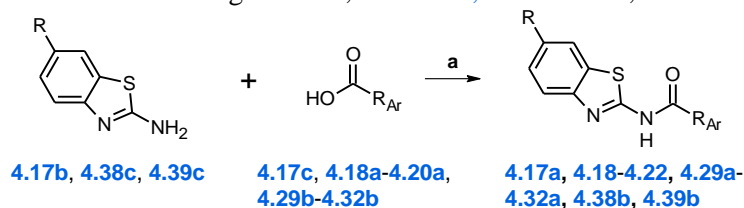


## 4.8 Synthese

### Synthese der Verbindungen 4.17a, 4.18-4.22, 4.29a-4.32a, 4.38b und 4.39b

Zur Darstellung der Verbindungen 4.17a, 4.18-4.22, 4.29a-4.32a, 4.38b und 4.39b erfolgte die Kupplung zwischen dem entsprechenden Amin (4.17b, 4.38c bzw. 4.39c) und der jeweiligen Benzoessäure (4.17c, 4.18a-4.20a bzw. 4.29b-4.32b) mit Hilfe von HOBT und EDC·HCl als Kupplungsreagenzien. Dabei konnten sehr gute Ausbeuten von bis zu 83% erhalten werden. Lediglich die Pyridine 4.20 und 4.21 und die Nitroverbindung 4.39b konnten nur mit befriedigenden Ausbeuten (50-60%) dargestellt werden (Schema 4.2).

#### Schema 4.2: Synthese der Verbindungen 4.17a, 4.18-4.22, 4.29a-4.32a, 4.38b und 4.39b.

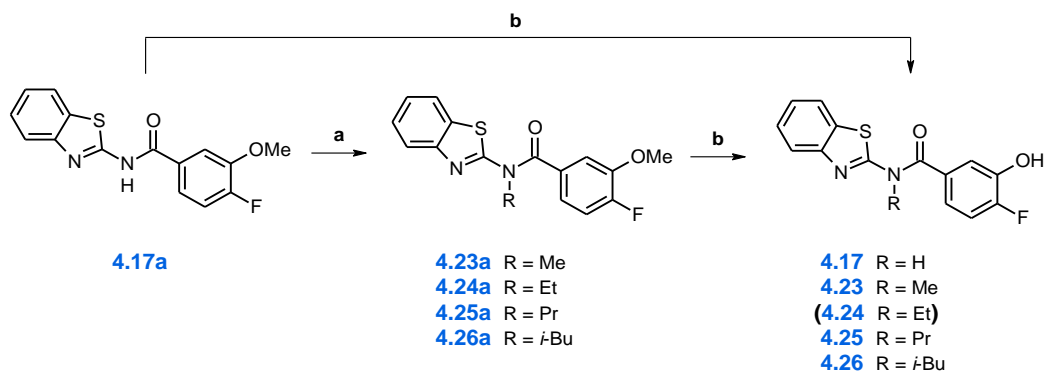


Bedingungen: a) HOBT, EDC·HCl, DIPEA, DCM, RT, über Nacht.

### Synthese der Verbindungen 4.17, 4.23, 4.25 und 4.26

Die Synthese der Verbindungen 4.17, 4.23, 4.25 und 4.26 erfolgte ausgehend von dem zuvor beschriebenen Amid 4.17a (Schema 4.2). Letztere wurde zunächst mit Natriumhydrid als Base deprotoniert und anschließend mit den entsprechenden Iodalkanen umgesetzt um die Zwischenverbindungen 4.23a-4.25a und 4.26a in Ausbeuten von 60-70% zu erhalten. Die Methoxygruppe der Verbindungen 4.17a, 4.23a, 4.24a und 4.26a wurde mittels BBr<sub>3</sub> gespalten um die Endstufen 4.17, 4.23, 4.25 und 4.26 in moderater bis ausgezeichneter Ausbeute (36-96%) zu erhalten. Auf die Synthese des Ethylderivats 4.24 wurde im Verlauf der Untersuchungen verzichtet.

#### Schema 4.3: Synthese der Verbindungen 4.17, 4.23, 4.25 und 4.26.

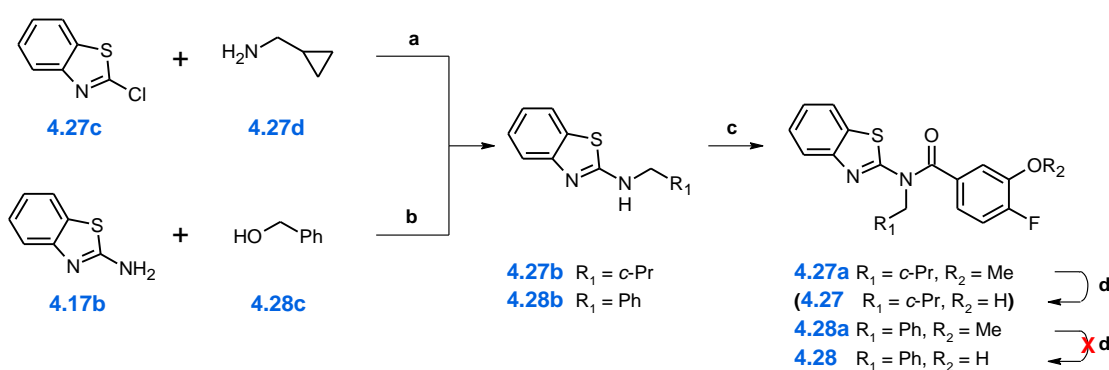


Bedingungen: a) DMF, NaH, 0 °C, Iodalkan, RT, über Nacht; b) BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht.

## Synthese der Verbindungen 4.27 und 4.28

Ausgehend von den Benzothiazolen **4.27c** und **4.17b** sollten die Zielverbindungen **4.27** und **4.28** in jeweils drei Stufen dargestellt werden. Nach einer von TOULOT *et al.*<sup>9</sup> beschriebenen Methode konnte Verbindung **4.27b** in einer kupferkatalysierten Reaktion vom Benzothiazol **4.27c** und dem Amin **4.27d** in einer Ausbeute von 59% erhalten werden. Verbindung **4.28b** wurde entsprechend einer Vorschrift von DONTIRI *et al.*<sup>10</sup> durch die Natriumhydroxid-katalysierte Umsetzung des Arylamins **4.17b** mit Benzylalkohol **4.28a** dargestellt (68% Ausbeute). Für die Bildung der Amide **4.27a** und **4.28a** wurde 4-Fluor-3-methoxybenzoesäure (**4.17c**) mit Thionylchlorid (SOCl<sub>2</sub>) zum Säurechlorid aktiviert und anschließend mit dem entsprechenden Amin (**4.27b** bzw. **4.28b**) umgesetzt. Trotz der Verwendung von 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) als Katalysator und einer längeren Reaktionszeit (bis zu 3 d) konnten die Zwischenstufen **4.27a** und **4.28a** lediglich in moderater bis befriedigender Ausbeute (27-45%) erhalten werden. Die Beobachtung von verbleibenden Startverbindungen lässt darauf schließen, dass die sekundären Amine relativ Reaktionsträge waren. Die Spaltung der Methoxygruppen des alkyltierten Amids **4.28a** wurde mit BBr<sub>3</sub> angestrebt, wobei die Bildung des gewünschten Produkts nicht beobachtet wurde. Vielmehr konnte mittels NMR-Spektroskopie die Abspaltung der Benzylgruppe nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf dieses Projektes wurde auf die Synthese der Verbindungen **4.27** und **4.28** verzichtet, da vermutlich aufgrund unzureichender Löslichkeit und inhärenter Eigenfluoreszenz Probleme mit dieser Gruppe von Verbindungen bei der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität festgestellt wurden (siehe Abschnitt 4.9.1).

### Schema 4.4: Synthese der Verbindungen 4.27 und 4.28.

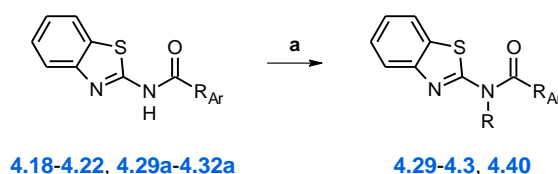


Bedingungen: **a**) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CuI, DMSO<sub>abs.</sub>, 120 °C, 48 h; **b**) NaOH, Toluol, 120 °C, 15 h; **c**) i) **4.17c**, SOCl<sub>2</sub>, DMF (kat.), Toluol<sub>abs.</sub>, 110 °C, 4 h; ii) **4.27b** bzw. **4.28b**, DCM<sub>abs.</sub>, Et<sub>3</sub>N, DMAP (kat.), RT, 3 d; **d**) BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C → RT, über Nacht.

### Synthese der Verbindungen 4.29-4.37 und 4.40

Die Synthese der Verbindungen 4.29-4.37 und 4.40 erfolgte ausgehend von den in Schema 4.2 beschriebenen Verbindungen 4.18-4.22 und 4.29a-4.32a. Die Umsetzung mit Natriumhydrid und Iodpropan bzw. Iodacetamid (für 4.40) wurde analog zu der in Schema 4.3 dargestellten Methode durchgeführt. Die Endstufen 4.29-4.37 und 4.40 konnten in Ausbeuten von 40-80% erhalten werden.

**Schema 4.5:** Synthese der Verbindungen 4.29-4.37 und 4.40.

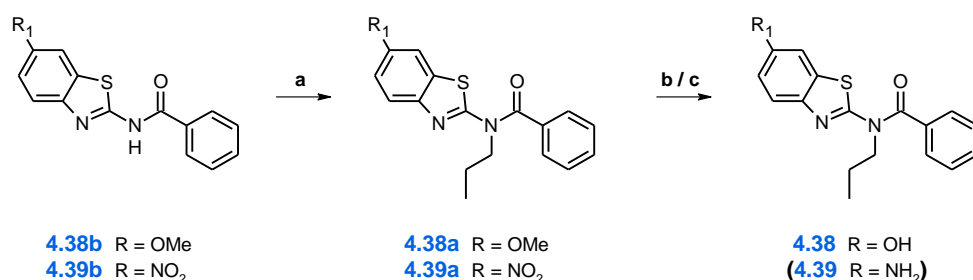


Bedingungen: **a)** DMF, NaH, 0 °C, Iodalkan, RT, über Nacht.

### Synthese der Verbindungen 4.38 und 4.39

Die Synthese der Verbindungen 4.38 und 4.39 erfolgte ausgehend von den in Schema 4.2 beschriebenen Verbindungen 4.38b und 4.39b. Die Umsetzung mit Natriumhydrid und Iodpropan resultierte in den Verbindungen 4.38a und 4.39a. Die Spaltung der Methoxygruppen von 4.38a erfolgte mit BBr<sub>3</sub> und lieferte die Endstufe 4.38 in guter Ausbeute von 47% über zwei Stufen (Schema 4.6). Die Synthese von Verbindung 4.39 wurde hingegen im weiteren Verlauf des Projekts nicht weiter verfolgt.

**Schema 4.6.** Synthese der Verbindungen 4.38 und 4.39.



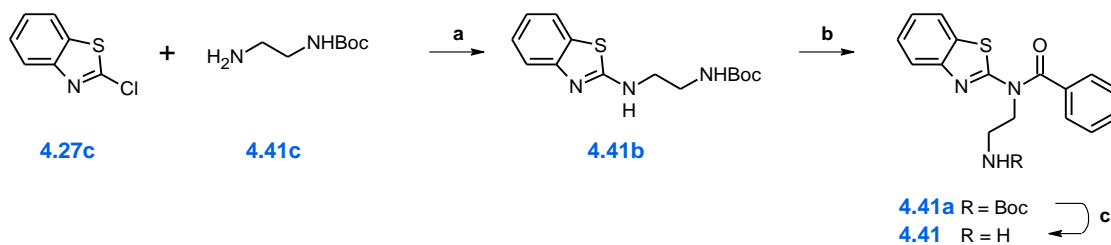
Bedingungen: **a)** DMF, NaH, 0 °C, Iodpropan, RT; **b)** BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C → RT, über Nacht.

### Synthese der Verbindung 4.41

Die Darstellung von Verbindung 4.41 konnte in drei Stufen ermöglicht werden (Schema 4.7). Entsprechend einer modifizierten Vorschrift von OUYANG *et al.*<sup>11</sup> wurde das Benzothiazol 4.27c mit kommerziell erhältlichem *N*-Boc-Ethylendiamin 4.41c umgesetzt, um Verbindung 4.41b in ausgezeichneter Ausbeute (92%) zu erhalten. Die anschließende Bildung des Amids 4.41a erfolgte mit

Hilfe von HOBt und EDC·HCl, welches mit TFA entschützt wurde. Die Zielverbindung **4.41** konnte mit einem sehr guten Ergebnis (61%) über zwei Stufen erhalten werden.

**Schema 4.7:** Synthese der Verbindung **4.41**.



Bedingungen: **a)** K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF<sub>abs.</sub>, 80 °C, 5 h; **b)** EDC·HCl, DIPEA, DCM, RT, über Nacht; **c)** TFA, RT, 3.5 h.

## 4.9 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14

### 4.9.1 Probleme während des fluoreszenzbasierten Assays

Um die inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen zu beurteilen, wurde angestrebt, den Fluoreszenzassay zu verwenden, der bereits in **Abschnitt 3** beschrieben wurde. Hierbei sind jedoch bei vielen Verbindungen Probleme aufgetreten, die im Folgenden zunächst beschrieben werden.

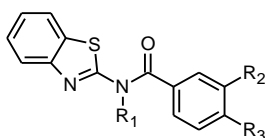
Zum einen kann für die meisten der untersuchten Verbindungen eine sehr geringe Löslichkeit beobachtet werden. Wie in **Kapitel 3** beschrieben, erfolgte die Bestimmung der Löslichkeit der Verbindungen in Phosphatpuffer (pH 7.4, 2% DMSO) bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Hierbei fallen vor allem die Substanzen mit einem alkylierten Amid mit einer Löslichkeit von weniger als 3  $\mu$ M negativ auf. Daher wurde die Löslichkeit der Verbindungen unter den im Assay verwendeten Bedingungen bei einer Inhibitorkonzentration von 2  $\mu$ M und 10  $\mu$ M getestet (pH 8, 1% DMSO). Es kann zumindest im Zeitfenster, das für die Durchführung der Inhibitionsassays benötigt wird, kein Ausfallen der getesteten Verbindungen festgestellt werden. Da während der Assays weitere Substanzzusätze wie Glucose und vor allem das Enzym in der Probelösung vorhanden sind, kann die Löslichkeit der Verbindungen dennoch nicht zweifelsfrei auch unter diesen Bedingungen bestätigt werden.

Ebenfalls aufgrund der geringen Löslichkeit von einigen der dargestellten Verbindungen, wurde deren inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M getestet. Danach ist für viele Verbindungen eine vermeintlich sehr hohe Potenz zu beobachten (60-90% Inhibition bei 1  $\mu$ M, **Tabelle 4.8**). Da während dem Assay eine Enzymkonzentration von 3-3.5  $\mu$ M eingestellt wurde, ist jedoch bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu$ M eine maximale Inhibition von ~33% realistisch. Dieses Phänomen kann auch für Verbindungen wie **4.23a** und **4.29** beobachtet werden, die eine ausreichende Löslichkeit aufweisen. Besonders auffällig ist, dass es sich dabei vorrangig um Methoxyvorstufen handelt, die aus Routinegründen mit getestet wurden. Wie aus **Kapitel 3** hervorgeht, konnte bis zu diesem Zeitpunkt keine inhibitorische Wirkung für Methoxyderivate beobachtet werden.

Ein drittes Problem stellt ein auffälliger Kurvenverlauf da, der während der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität zu beobachten ist und die Bestimmung der Inhibitionskonstante  $K_i$  beeinträchtigt. So ist bei höheren Inhibitorkonzentrationen (bis zu 10  $\mu$ M) eine Auswertung der Ergebnisse nicht bzw. nur näherungsweise möglich. In **Abb. 4.8** ist die Auftragung der Fluoreszenz gegen die Zeit bei verschiedenen Konzentrationen der Verbindungen **3.8**, **4.25** und **4.27** veranschaulicht. Für den Inhibitor **3.8** ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Produktbildung

(Fluoreszenz von NADH) und der Reaktionszeit zu erkennen. Aus den Steigungen der Geraden kann somit nach der Gleichung von MORRISON<sup>5</sup> der  $K_i$  Wert für diese Verbindungen ohne Probleme bestimmt werden (vgl. **Kapitel 3**). Für Verbindung **4.25** hingegen wird zum einen bei hohen Inhibitorkonzentrationen eine starke Fluoreszenz beobachtet, die von den Inhibitoren selbst stammt. Zudem ist kein linearer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz und der Reaktionszeit zu erkennen. Vielmehr sinkt sie zu Beginn der Reaktion und erreicht dann ein Plateau. Ausgehend von diesem Plateau kann angenommen werden, dass das Enzym bei dieser Inhibitorkonzentration vollständig inhibiert ist. Die Bestimmung eines  $K_i$  Werts ist somit lediglich näherungsweise möglich. Bei einer Inhibitorkonzentration von 2  $\mu$ M kann erneut ein linearer Zusammenhang beobachtet werden, sodass die prozentuale Hemmung bei dieser Konzentration einen Vergleich mit anderen Inhibitoren zulässt (siehe **Tabelle 4.10**). Für Verbindung **4.27** kann hingegen auch bei einer Konzentration von 0.88  $\mu$ M kein linearer Zusammenhang nachgewiesen werden. Zudem ist festzustellen, dass bei 1.32  $\mu$ M zunächst ein Abfall der Fluoreszenz und ein anschließender Anstieg dieser zu verzeichnen ist. Somit kann mit dem beschriebenen Assay keine zuverlässige Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Verbindung **4.27** durchgeführt werden.

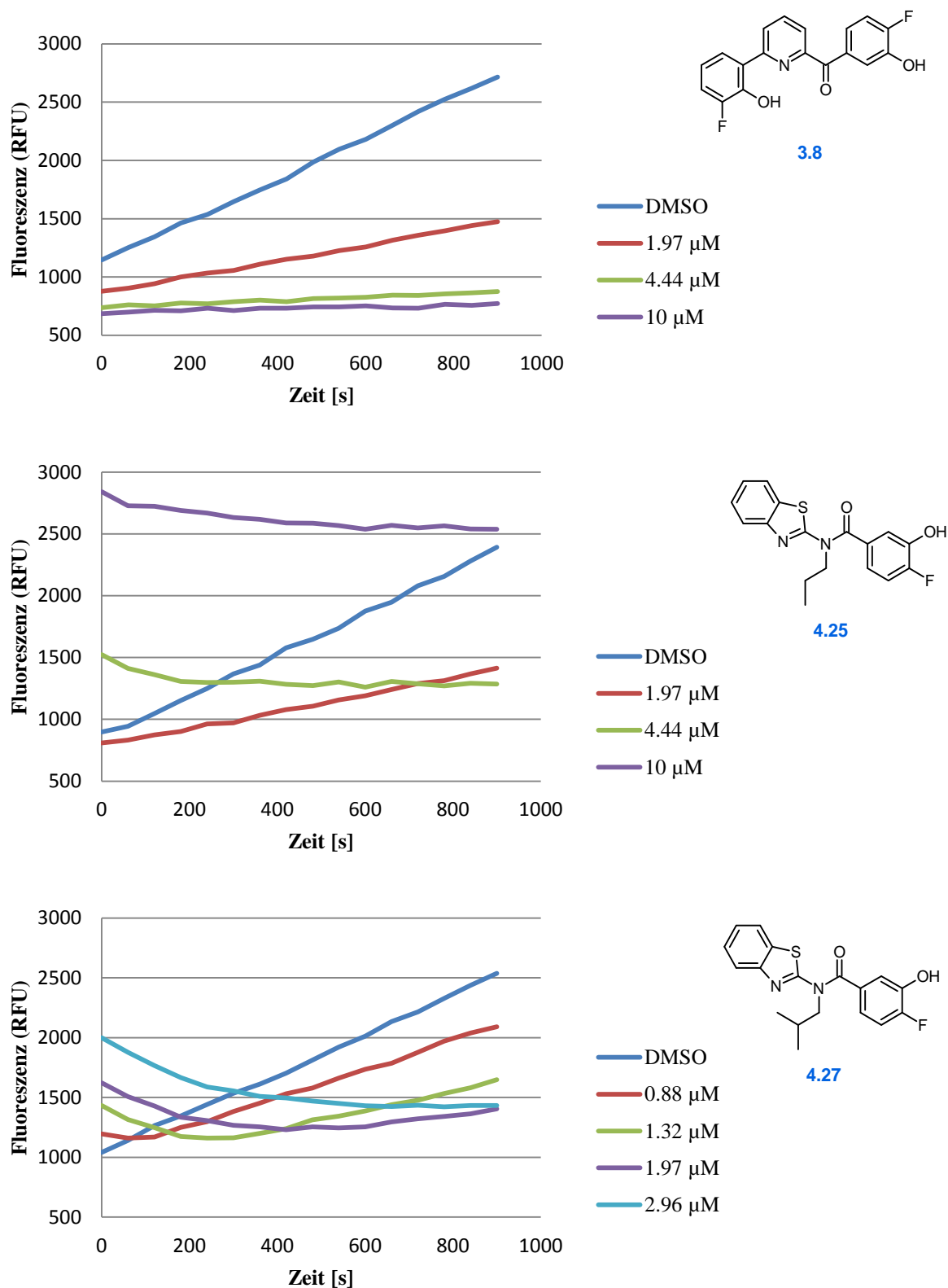
**Tabelle 4.8:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 von Benzothiazolamiden mit Propylseitenkette.



**4.23a-4.25a, 4.29-4.32**

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 1 $\mu$ M) <sup>a</sup>	Löslichkeit ( $\mu$ M)
<b>4.23a</b>	Me	OMe	F	83	12.5-25
<b>4.24a</b>	Et	OMe	F	61	< 3.1
<b>4.25a</b>	Pr	OMe	F	84	< 3.1
<b>4.29</b>	Pr	H	OMe	89	6.3-12.5
<b>4.30</b>	Pr	OMe	H	79	< 3.1
<b>4.31</b>	Pr	F	H	70	< 3.1
<b>4.32</b>	Pr	H	F	79	< 3.1

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25 °C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen; k.i.: keine Inhibition.



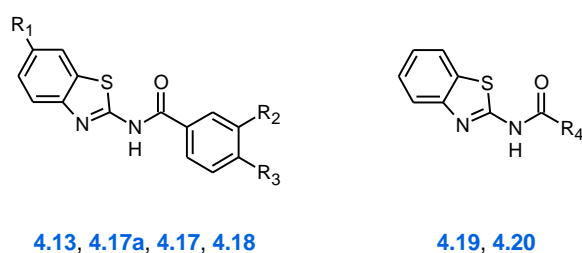
**Abb. 4.8.** Auftragung der Fluoreszenz (*relative fluorescence units*, RFU) gegen die Zeit bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen der Verbindungen **3.8**, **4.25** und **4.27**.

### 4.9.2 Beschreibung der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse derjenigen Verbindungen vorgestellt, für die eine Auswertung der inhibitorischen Daten als verlässlich gelten darf.

Ausgehend von der Startverbindung **4.13** wurden Inhibitoren mit unterschiedlichen aromatischen C-Ringen auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 untersucht. Die Eliminierung der 6-OH Gruppe am Benzothiazolring resultiert in einem Verlust an Affinität, wie man es durch den Vergleich der Verbindungen **4.13** (53% Inhibition bei 2  $\mu$ M;  $K_i$  = 42 nM) und **4.17** (37% Inhibition bei 2  $\mu$ M;  $K_i$  = 132 nM) beobachten kann. Das Methoxyderivat **4.17a** und Verbindung **4.18** (keine Inhibition bei den gewählten Bedingungen) mit einem unsubstituierten C-Ring verdeutlichen die Bedeutung des 3-OH/4-F Motivs am Phenylring für die Enzymhemmung (vgl. **Abschnitt 4.7**). So zeigen die Verbindungen mit einem Pyridinsubstituenten (**4.19** und **4.20**) ebenfalls keine Inhibition unter den gewählten Assaybedingungen (**Tabelle 4.9**). Für diese Verbindungen können verlässliche Ergebnisse erhalten werden, da sie eine gute Löslichkeit besitzen und einen linearen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz und Zeit aufweisen.

**Tabelle 4.9:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 von Benzothiazolamiden mit unterschiedlichen C-Ringen.



Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ (nM) <sup>b</sup>	Löslichkeit ( $\mu$ M)
<b>4.13</b>	OH	OH	F	-	53	42	50-100
<b>4.17a</b>	H	OMe	F	-	k.i.	n.b.	25-50
<b>4.17</b>	H	OH	F	-	37	132	25-50
<b>4.18</b>	H	H	H	-	k.i.	n.b.	50-100
<b>4.19</b>	-	-	-	Pyridin-2-yl	k.i.	n.b.	25-50
<b>4.20</b>	-	-	-	Pyridin-3-yl	k.i.	n.b.	50-100

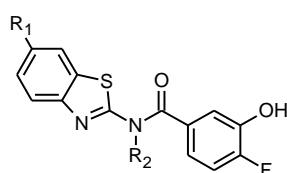
<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25 °C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen, k.i.: keine Inhibition; <sup>b</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25 °C, Einzelerperimenten mit drei technischen Wiederholungen, n.b.: nicht bestimmt.



Wie in **Abschnitt 4.7** beschrieben, stellte sich **4.16** als vielversprechende Leitstruktur zur Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren heraus. Ausgehend von dieser Substanz wurden Verbindungen mit unterschiedlichen hydrophoben Seitenketten entworfen. In **Tabelle 4.10** sind die aus diesem Ansatz hervorgegangenen Verbindungen dargestellt, für die eine Bestimmung der prozentualen Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 2  $\mu$ M möglich ist.

Anders als für die unsubstituierten Amide, führt in dieser Unterklasse basierend auf den Daten für diese Substanzpaare der Verzicht auf die 6-OH Gruppe am Benzothiazolring zu einem kleinen Gewinn an Affinität gegenüber dem Target (**4.16**: 51% vs. **4.23**: 67% Inhibition bei 2  $\mu$ M). Auch Verbindung **4.25** mit einer Propylkette zeigt eine ähnliche Potenz (62% Inhibition bei 2  $\mu$ M) zum Target.

**Tabelle 4.10:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 von Benzothiazolamiden mit alkylierten Amidfunktionen.

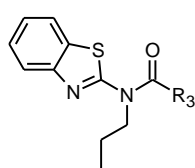


**4.16, 4.23, 4.25**

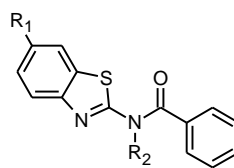
Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	Löslichkeit ( $\mu$ M)
<b>4.16</b>	OH	Me	51	50-100
<b>4.23</b>	H	Me	67	25-50
<b>4.25</b>	H	Pr	62	< 3.1

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25 °C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen; k.i.: keine Inhibition, n.b.: nicht bestimmt, n.a.: nicht auswertbar.

Die in **Tabelle 4.11** gelisteten Verbindungen wurden ausgehend von **4.25a** und **4.33** entworfen, für die eine vermeintlich hohe inhibitorische Aktivität angenommen wurde (vgl. **Tabelle 4.8**). Um die Löslichkeit von diesen Substanzen zu erhöhen, wurden Pyridinsubstituenten und polare Seitenketten am Amid eingeführt. Ferner wurde die Funktionalisierung des Benzothiazolgerüsts mit polaren Gruppen durchgeführt. Für die Verbindungen **4.34-4.36**, **4.38-4.41** kann in Folge dessen ein befriedigendes bis sehr gutes Löslichkeitsverhalten bestimmt werden. Allerdings ist für alle Verbindungen keine Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 bei einer Konzentration von 2  $\mu$ M festzustellen (**Tabelle 4.11**).

**Tabelle 4.11:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 von Benzothiazolamiden mit Propylseitenkette.


4.34-4.36



4.38-4.41

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 2 $\mu$ M) <sup>a</sup>	Löslichkeit ( $\mu$ M)
4.34	-	-	Pyridin-2-yl	k.i.	100-200
4.35	-	-	Pyridin-3-yl	k.i.	25-50
4.36	-	-	Pyridin-4-yl	k.i.	25-50
4.38	OH	Pr	-	k.i.	12.5-25
4.39a	NO <sub>2</sub>	Pr	-	k.i.	6.3-12.5
4.40	H	CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	-	k.i.	25-50
4.41	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	-	k.i.	>200

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25 °C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen; k.i.: keine Inhibition.

## 4.10 Diskussion der Ergebnisse

### 4.10.1 Probleme während des fluoreszenzbasierten Assays

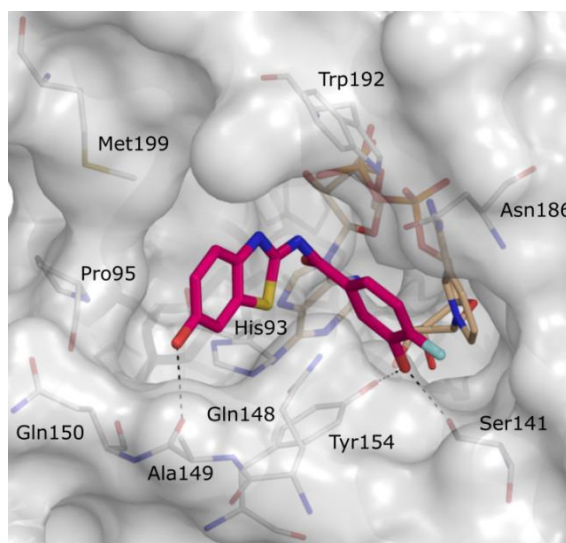
Durch einen auffälligen Kurvenverlauf, der während der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität beobachtet wurde, war eine Bestimmung von  $K_i$  Werten für viele der dargestellten Verbindungen nicht möglich. Für einige Verbindungen war es zudem nicht möglich die prozentuale Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 2  $\mu$ M zu bestimmen. Es ist zu vermerken, dass diese Beobachtung mit der geringen Löslichkeit der Substanzen zusammenhängt, da dieses Verhalten vor allem für diese Derivate zu registrieren war.

Die hohe Eigenfluoreszenz vieler der dargestellten Verbindungen wird höchstwahrscheinlich zudem die erhaltenen Ergebnisse verfälscht haben. Alternativ zu dem hier verwendeten fluoreszenzbasierten Assay könnten auf einem abweichenden Prinzip basierende Messmethoden angewendet werden. Es wäre möglich, von dem in der AG J. ADAMSKI (Helmholtz Zentrum München) verwendeten Verdrängungsassay Gebrauch zu machen. Bei diesem wird das Verhältnis der radioaktiv markierten Steroide E1 und E2 nach deren HPLC-Trennung bestimmt. So wurde mit dieser Methode Verbindung **4.16** in der vorangegangenen Studie untersucht (vgl. **Tabelle 4.10**). Ebenfalls könnte ein von der Firma Promega angebotenes Assaysystem verwendet werden, mit dem lumineszenzbasiert das Verhältnis von NAD<sup>+</sup> und NADH bestimmt wird.<sup>12</sup>

### 4.10.2 Inhibitorische Aktivitäten gegenüber 17 $\beta$ -HSD14

Für den Inhibitor **4.13** kann eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 (51% Inhibition bei 2  $\mu$ M), als auch eine bereits gute Selektivität gegenüber dem Subtypen 2 ( $IC_{50}$  = 1480 nM) bestimmt werden. Besonders der zweite Aspekt spielt eine wichtige Rolle, da die inhibitorische Aktivität gegenüber diesem Enzym schwer zu kontrollieren ist (vgl. **Abschnitt 3.7**). Ausgehend von Verbindung **4.13** konnten Verbindungen mit einer guten Löslichkeit dargestellt werden, welche die Wichtigkeit des 3-OH/4-F Motivs am Phenylring untermauern (siehe **Tabelle 4.9**). Somit kann für den Phenylring des Liganden **4.13** ein analoger Bindungsmodus vermutet werden, wie er für den C-Ring in der Pyridinketonklasse (**Kapitel 3**) beschrieben wurde. Die Entfernung der 6-OH Gruppe am Benzothiazolring resultiert in einem Verlust an Affinität, wie man es durch den Vergleich von Verbindungen **4.13** (53% Inhibition bei 2  $\mu$ M) mit **4.17** (37% Inhibition bei 2  $\mu$ M) beobachten kann. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass diese Hydroxygruppe eine spezifische Interaktion mit dem Protein eingeht. Da von den hier vorgestellten Verbindungen keine Kristallstruktur im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14 erhalten wurde, dienten die in **Kapitel 3** beschriebenen Strukturen als Grundlage zum Anfertigen einer modellierten Struktur des Liganden **4.13** im Komplex mit dem Protein (**Abb. 4.9**). Hierzu wurde das Computerprogramm MOE verwendet. Anhand dieser Struktur konnte eine gute

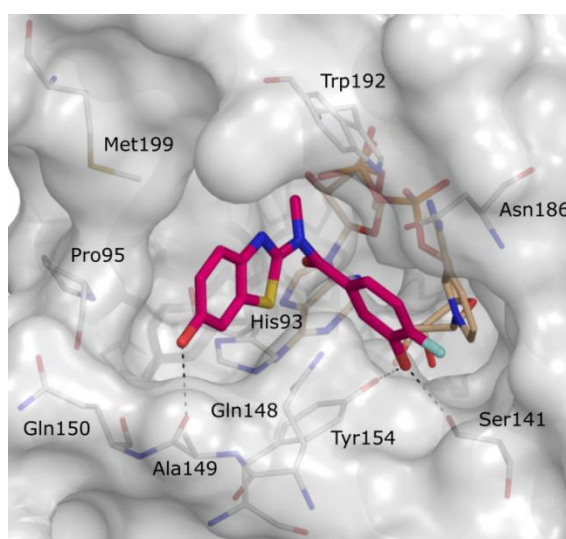
Anpassung des Inhibitors an die aktive Tasche des Targets beobachtet werden, nach der eine Interaktion der 3-OH am Phenylring mit Tyr154 der katalytischen Triade möglich ist. Ebenfalls konnte eine potentielle Interaktion der 6-OH Gruppe am Benzothiazolring mit der *backbone*-Carbonylgruppe von Ala149 vorgeschlagen werden. In **Kapitel 3** wurde die Interaktion mit Ala149 als eher weniger stark zur Bindungsaffinität beitragend beschrieben. Daher wäre der mit MOE erhaltene Strukturvorschlag durch eine Kristallstruktur von Verbindung **4.13** im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14 zu überprüfen.



**Abb. 4.9:** Modellierter Struktur von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit Verbindungen **4.13**. Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) in grau dargestellt. Der Inhibitor ist als Stäbchenmodell und ausgewählte Aminosäuren und der Cofaktor (NAD<sup>+</sup>) sind mit schmalen Bindung abgebildet. Die Kohlenstoffatome des Inhibitors sind in rot dargestellt. Mögliche H-Brücken sind als gestrichelte Linien veranschaulicht.

Für das methylierte Analogon des Inhibitors **4.13** wurde in der vorherigen Studie im direkten Vergleich mit Verbindung **4.16** eine höhere inhibitorische Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 festgestellt (**4.13**: 53% vs. **4.16**: 78% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Es wurde vermutet, dass die zusätzliche Methylgruppe weitere hydrophobe Interaktionen mit dem Protein eingeht, sodass unterschiedliche Alkylsubstituenten am Amid eingeführt wurden. Der Vergleich des propylsubstituierten Liganden **4.25** (62% Inhibition bei 2  $\mu$ M) mit den Verbindungen **4.34-4.35** (keine Inhibition bei 2  $\mu$ M) lässt auch in dieser Unterklasse auf die Wichtigkeit des 3-OH/4-F Motivs am Phenylring schließen. Für Verbindung **4.16** kann daher ein vergleichbarer Bindungsmodus wie für das nicht alkylierte Analogon **4.13** angenommen werden. Diese Annahme wurde ebenfalls durch eine modellierte Struktur untersucht (**Abb. 4.10**). Demnach wäre die Methylgruppe in einer hydrophoben Tasche positioniert. Die Einführung von verlängerten Alkylgruppen an dieser Position erscheint daher generell sinnvoll. Durch die Alkylierung der Amidgruppe folgen jedoch die zuvor beschriebenen Probleme der Löslichkeit und

erstaunlicherweise kann für diese Untergruppe die starke Eigenfluoreszenz beobachtet werden. Somit lässt der fluoreszenzbasierte Assay eine Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten der dargestellten Substanzen dieser Unterklasse nicht zu. Anhand des Modells ist ebenfalls eine Interaktion der 6-OH Gruppe am Benzothiazolring mit der *backbone*-Carbonylgruppe von Ala149 zu beobachten. Mit einiger Vorsicht, was die Zuverlässigkeit der Assaywerte betrifft, lässt sich feststellen, dass die 6-OH Gruppe am Benzothiazolring der alkylierten Amide nicht vergleichbar essentiell für eine gute Bindung an das Target erscheint (4.16: 51% vs. 4.23: 67% Inhibition bei 2  $\mu$ M). Der abweichende Trend im Vergleich zu den nicht alkylierten Amiden 4.13 und 4.17 suggeriert möglicherweise einen Unterschied im Bindungsmodus, der unbedingt durch eine Kristallstruktur zu prüfen ist. In jedem Fall aber spielt diese Hydroxygruppe eine entscheidende Rolle für die Löslichkeit dieser Verbindungsklasse.

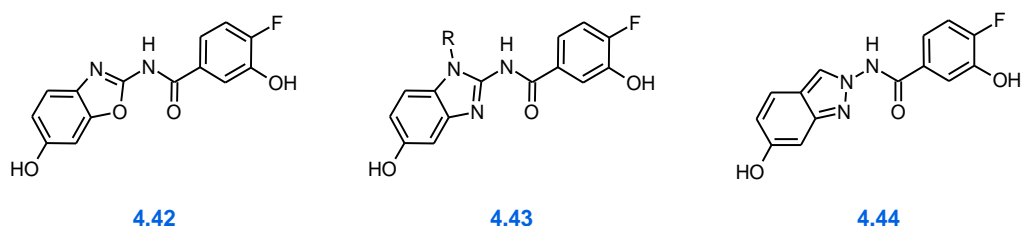


**Abb. 4.10.** Modellierter Struktur von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit Verbindung 4.16. Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) in grau dargestellt. Der Inhibitor ist als Stäbchenmodell und ausgewählte Aminosäuren und der Cofaktor (NAD<sup>+</sup>) sind mit schmalen Bindungen abgebildet. Die Kohlenstoffatome des Inhibitors sind in rot dargestellt. Mögliche H-Brücken sind als gestrichelte Linien veranschaulicht.

## 4.11 Fazit

In der Klasse der Benzothiazolamide konnten das unsubstituierte Amid **4.13** und *N*-methylierte Amid **4.16** als vielversprechende Startverbindungen zur Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren identifiziert werden.

Inhibitor **4.13** ist interessant, da er eine gute Selektivität gegenüber dem Subtypen 2 aufweist. Ausgehend von dieser Verbindung könnte somit das Aufstellen einer systematische Struktur-Aktivitätsbeziehung angestrebt werden, um die Selektivitätskriterien genauer zu erforschen. So wurde in **Abschnitt 4.5.1** beschrieben, dass ein Schwefelatom in der Kernstruktur zu einer höheren inhibitorischen Potenz gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 und -2 führt. Beispielsweise könnte so der Austausch des Benzothiazols gegen ein Benzoxazol- (**4.42**), ein Imidazol- (**4.43**) oder ein Indazolmotiv (**4.44**) einen weiteren Selektivitätsvorteil hervorbringen (**Abb. 4.11**). Die Imidazolstruktur würde den weiteren Vorteil mit sich bringen, dass unterschiedliche Rester (R) in Position 1 untersucht werden könnten. Weiterhin sollte eine Kristallstruktur mit der Verbindung **4.13** erhalten werden, um den Bindungsmodus der modellierten Struktur (**Abb. 4.9**) zu überprüfen und um anschließend strukturbasierte Modifikationen vornehmen zu können.



**Abb. 4.11:** Potentielle 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren mit unterschiedlichen Kernmotiven.

Der Entwurf der Verbindungen **4.23-4.28** (**Abb. 4.7**), ausgehend vom Inhibitor **4.16**, war generell sinnvoll, um den Einfluss unterschiedlicher Substituenten am Amid zu untersuchen. Allerdings sollten diese durch polare Substituenten am Benzothiazolmotiv ergänzt werden, um eine ausreichende Löslichkeit dieser Verbindungen nach den Modifikationen zu gewährleisten. Wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert wurde, müssten diese Verbindungen allerdings mit Hilfe eines alternativen Assays getestet werden, um eine überlagerte Verfälschung der Assaydaten durch die Eigenfluoreszenz der Verbindungen ausschließen zu können.

## 4.12 Experimental Section

### 4.12.1 Chemistry

#### Chemical methods

Chemical names follow IUPAC nomenclature.

Starting materials were purchased from Acros Organics, Alfa Aesar, Combi-Blocks, Roth and Sigma Aldrich and were used without further purification. Anhydrous THF was freshly distilled from sodium benzophenone ketyl.

Microwave irradiation experiments were carried out in a CEM-Discover apparatus.

Column chromatography was performed on silica gel (0.04-0.063 mm, Macherey-Nagel) and reaction progress was monitored by TLC on aluminium sheets (Silicagel 60 F254, Merck). Visualization was accomplished with UV light at 254 nm and 366 nm, respectively.

Preparative HPLC was performed with a Varian PrepStar 218 gradient system using a ProStar 320 detector. A ProntoSIL C18 column (5.0  $\mu$ m, 120 Å, 250-32 mm) was used with an acetonitrile/water gradient containing 0.1% TFA at a flow rate of 20 ml/min. All solvents were HPLC grade. Detection was performed at a wavelength of 254 nm.

Mass spectrometry was performed on a Q-Trap 2000 (Applied Biosystems) equipped with an electrospray interface (ESI).

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were measured on a JEOL ECX-400 spectrometer (at 400 MHz and 100 MHz, respectively). Chemical shifts are reported in  $\delta$  (parts per million: ppm), using residual peaks for the deuterated solvents as internal standard:<sup>13</sup> 2.05 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 29.8 ppm and 206.3 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR), acetone- $d_6$ ; 7.26 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 77.2 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR),  $\text{CDCl}_3$ ; 2.50 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 39.5 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR), DMSO- $d_6$ . Signals are described as s, bs, d, t, q, dd, ddd, dt and m for singlet, broad signal, doublet, triplet, doublet of doublets, doublet of doublet of doublets, doublet of triplets and multiplet, respectively. All coupling constants ( $J$ ) are given in Hertz (Hz).

Infrared spectroscopy was performed on a Bruker ALPHA FT-IR spectrometer as neat sample.

The purity of the compounds was evaluated by HPLC. The Shimadzu-system consisted of a LC-20AT pump, an SIL-20A autosampler and a SPD-M20A PDA detector. The system was operated by the standard software LCsolution<sup>®</sup>. A RP C18 NUCLEODUR<sup>®</sup> (125 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m) column (Macherey-Nagel) was used. All solvents were HPLC grade. In a gradient run the percentage of acetonitrile (containing 0.1% trifluoroacetic acid) in water (containing 0.1% trifluoroacetic acid) was increased from initial concentration of 30% at 0 min to 90% at 15 min and kept at 90% for 5 min (HPLC-method A) or from initial concentration of 10% at 0 min to 90% at 20 min and kept at 90% for 5 min (HPLC-method B). The injection volume was 25  $\mu$ l at a flow rate of 1.00 ml/min. UV spectra were recorded at a wavelength of 254 nm.

*N*-benzyl-1,3-benzothiazol-2-amine (**4.28b**) was prepared according to previously described procedure.<sup>10</sup>

## **General synthesis procedures**

### **General procedure for alcohol formation**

#### **Method 4.A**

A solution of *n*-BuLi (1.0 eq, 2.5 M in hexane) was diluted with anhydrous THF to a final concentration of 0.8 M and arylbromide (1.0 eq) in anhydrous THF was slowly added at -80 °C under argon. The resulting solution was stirred for 1 h at -80 °C. The appropriate aldehyde (1.1 eq) was added and the reaction solution was stirred for additional 30 min at -80 °C followed by room temperature for 2 h. The mixture was quenched with saturated ammonium chloride and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### **General procedure for alcohol oxidation**

#### **Method 4.B**

2-Iodoxybenzoic acid (1.2 eq) was added to a solution of alcohol derivative (1.0 eq) in THF and the reaction mixture was stirred at 60 °C. After the end of the reaction (monitored by TLC) the mixture was cooled to room temperature, quenched with saturated sodium thiosulfate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water and saturated sodium bicarbonate, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### **General procedure for ether cleavage**

#### **Method 4.C**

A solution of methoxy derivative (1.0 eq) in dry dichloromethane was cooled to -80 °C and boron tribromide (1.0 M in dichloromethane, 5.0 eq per methoxy function) was slowly added. The reaction mixture was stirred at -80 °C for 1 h and then allowed to warm to room temperature overnight. The mixture was cooled in an ice bath, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography.



## General procedures for SUZUKI-MIYaura couplings

### Method 4.D1

A mixture of arylbromide (1.0 eq), boronic acid (1.2 eq), cesium carbonate (4.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.02 eq) was solved in DME/water (2:1), degassed and charged with argon. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The reaction mixture was cooled down to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### Method 4.D2

A mixture of arylbromide (1.0 eq), boronic acid (1.2 eq), sodium carbonate (2.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.02 eq) was solved in DME/water (2:1), degassed and charged with argon. The mixture was exposed to microwave irradiation (60 min, 150 W, 150 °C) and quenched with water after reaching room temperature. The mixture was extracted with ethyl acetate and the combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

## General procedures for amide formation

### Method 4.E1

To a solution of carboxylic acid derivative (1.0 eq), amine derivative (1.1 eq), HOBt (1.1 eq) and EDC·HCl (1.1 eq) in dichloromethane, DIPEA (2.3 eq) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was taken up in ethyl acetate. The organic layer was washed three times with 0.5 N HCl, saturated sodium bicarbonate and brine. Then dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was used without further purification.

### Method 4.E2

A solution of carboxylic acid derivative (1.0 eq, 0.2 M), thionyl chloride (2.0 eq) and dimethylformamide (catalytic amount) in toluene was stirred at 110 °C for 4 h under argon atmosphere. The mixture was cooled down to room temperature and the solvent as well as the excess of thionyl chloride were removed under reduced pressure. The residue was solved in dry dichloromethane (0.2 M) and the appropriate amine (1.0 eq) as well as trimethylamine (1.0 eq), and 4-dimethylaminopyridine (catalytic amount) were added at 0 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was taken up in ethyl acetate. The organic layer was washed with

0.5 M hydrochloric acid, saturated sodium bicarbonate and brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography.

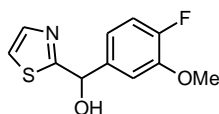
### General procedure for amide modification

#### Method 4.F

A solution of amide derivative (1.0 eq) in dimethylformamide was cooled to 0 °C and sodium hydride (1.5 eq) was added. The mixture was warmed to room temperature for 20 min and cooled down again to 0 °C. The corresponding organoiodine derivative (2.0 eq) was added and the reaction mixture was stirred at room. The end of the reaction was monitored by TLC. Water was added to quench the reaction and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography.

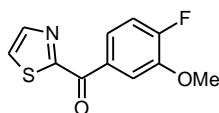
### Detailed synthesis procedures and compounds characterization

#### (4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(1,3-thiazol-2-yl)methanol (**4.7b**).

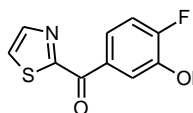


According to **method 4.A** the title compound was prepared by reaction of 1,3-thiazole (**4.7c**) (71  $\mu$ l, 1.0 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (**3.6e**) (170 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 1:1) to give 189 mg (0.79 mmol/ 79%) of the analytically pure compound.  $C_{11}H_{10}FNO_2S$ ; MW: 239;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.71 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1H), 7.32 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 1H), 7.12 (dd,  $J$  = 8.1 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.06 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.3 Hz, 1H), 6.99 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 4.4 Hz, 2.1 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 3.96 (bs, 1H), 3.87 (s, 3H); **MS** (ESI): 240 ( $M+H$ ) $^+$ .

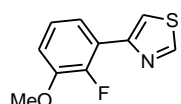
#### (4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(1,3-thiazol-2-yl)methanone (**4.7a**).



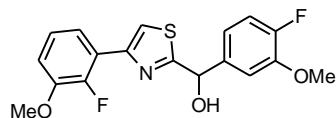
According to **method 4.B** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(1,3-thiazol-2-yl)methanol (**4.7b**) (177 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (250 mg, 0.89 mmol, 1.2 eq) for 3 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 118 mg (0.50 mmol/ 67%) of the analytically pure compound.  $C_{11}H_8FNO_2S$ ; MW: 237;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.31 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 8.14 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 8.09 (d,  $J$  = 3.1 Hz, 1H), 7.73 (d,  $J$  = 3.1 Hz, 1H), 7.21 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H); **MS** (ESI): 238 ( $M+H$ ) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)(1,3-thiazol-2-yl)methanone (4.7).**

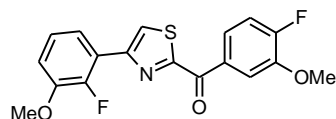
According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(1,3-thiazol-2-yl)methanone (**4.7a**) (71 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.5 ml, 1.5 mmol, 5 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 56 mg (0.25 mmol, 84%) of the analytically pure compound.  $C_{10}H_6FNO_2S$ ; MW: 223; **mp**: 174-175 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  10.38 (s, 1H), 8.27 (d,  $J$  = 3.1 Hz, 1H), 8.23 (d,  $J$  = 3.1 Hz, 1H), 8.07 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.99 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.35 (dd,  $J$  = 11.0 Hz, 8.6 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  181.9, 167.0, 154.8 (d,  $J$  = 251.5 Hz), 145.3, 145.1 (d,  $J$  = 12.3 Hz), 131.4 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 128.3, 123.4 (d,  $J$  = 8.1 Hz), 120.1 (d,  $J$  = 5.0 Hz), 116.4 (d,  $J$  = 19.2 Hz); **IR**: 3399, 1591, 1432, 1095, 823, 760  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 224 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 8.60 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

**4-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazole (4.8c).**

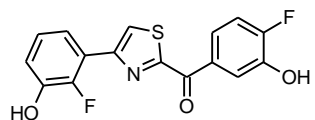
According to **method 4.D2** the title compound was prepared by reaction of 4-bromo-1,3-thiazole (**4.8c**) (45  $\mu$ l, 0.5 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (102 mg, 0.6 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 93 mg (0.44 mmol/ 89%) of the analytically pure compound.  $C_{10}H_8FNOS$ ; MW: 209;  $^1H$  NMR (CDCl $_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.87 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 7.85 (t,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.80 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.6 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.16 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.96 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.3 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (CDCl $_3$ , 100 MHz):  $\delta$  151.9, 150.3 (d,  $J$  = 249.7 Hz), 149.8 (d,  $J$  = 1.9 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 124.2 (d,  $J$  = 4.7 Hz), 122.9 (d,  $J$  = 9.0 Hz), 121.3 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 117.7 (d,  $J$  = 15.2 Hz), 112.8 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 56.5 (d,  $J$  = 5.3 Hz); **MS** (ESI): 210 (M+H) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanol (4.8b).**

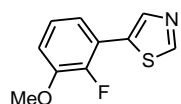
According to **method 4.A** the title compound was prepared by reaction of 4-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazole (**4.8c**) (87 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (**3.6e**) (77 mg, 0.50 mmol, 1.2 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1  $\rightarrow$  4:1) to give 92 mg (0.25 mmol/ 61%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{15}F_2NO_3S$ ; MW: 363;  $^1H$  NMR (CDCl $_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.81-7.69 (m, 2H), 7.20-7.01 (m, 4H), 6.99-6.91 (m, 1H), 6.05 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H); **MS** (ESI): 364 (M+H) $^+$ .

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanon (4.8a).**


According to **method 4.B** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanol (**4.8b**) (92 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (85 mg, 0.3 mmol, 1.2 eq) for 1.5 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 76 mg (0.21 mmol/ 84%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S; MW: 361; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.39 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 8.29 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 8.14 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 7.79-7.73 (m, 1H), 7.24 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.22-7.17 (m, 1H), 7.03-6.98 (m, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.95 (s, 3H); MS (ESI): 362 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[4-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanone (4.8).**


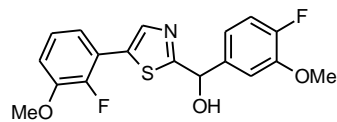
According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanon (**4.8a**) (76 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (2.1 ml, 2.1 mmol, 10 eq) in dichloromethane (4.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 4:1  $\rightarrow$  3:1) to give 60 mg (0.18 mmol, 86%) of the analytically pure compound. C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S; MW: 333; mp: 174-175 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  10.46 (bs, 1H), 10.07 (bs, 1H), 8.45 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.14 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.0 Hz, 1H), 8.06 (ddd,  $J$  = 7.9 Hz, 4.3 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.57 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 7.40 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.7 Hz, 1H), 7.15 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.03 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  181.6, 166.0, 152.4 (d,  $J$  = 239.9 Hz), 150.6, 149.0 (d,  $J$  = 246.8 Hz), 145.7 (d,  $J$  = 12.1 Hz), 145.1 (d,  $J$  = 12.4 Hz), 131.2 (d,  $J$  = 2.8 Hz), 126.0 (d,  $J$  = 13.4 Hz), 124.6 (d,  $J$  = 4.3 Hz), 123.4 (d,  $J$  = 7.9 Hz), 122.0, 120.1 (d,  $J$  = 11.4 Hz), 119.3, 118.0 (d,  $J$  = 3.9 Hz), 116.5 (d,  $J$  = 18.8 Hz); IR: 3408, 1590, 1487, 1216, 779, 770, 752 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 334 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 12.73 min; peak area, 98.7%, HPLC-method A.

**5-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazole (4.9c).**


According to **method 4.D1** the title compound was prepared by reaction of 5-bromo-1,3-thiazole (90  $\mu$ l, 1.0 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (204 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq) in DME/water (12.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 162 mg (0.78 mmol/ 87%) of the analytically pure compound. C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>FNOS; MW: 209; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.83 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.17 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 6.0 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.11 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.3 Hz, 1H), 6.95 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.7 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  153.2 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 149.2 (d,  $J$  = 250.3 Hz), 148.6 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 142.1 (d,  $J$  = 6.8 Hz), 132.0 (d,  $J$  = 3.9 Hz), 124.5 (d,

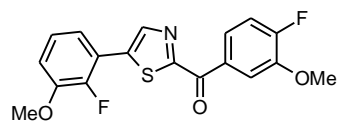
$J = 4.7$  Hz), 120.5 (d,  $J = 2.3$  Hz), 120.0 (d,  $J = 11.1$  Hz), 113.0 (d,  $J = 2.0$  Hz), 56.5; **MS** (ESI): 210 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanol (4.9b).**



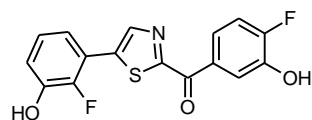
According to **method 4.A** the title compound was prepared by reaction of 5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazole (**4.9a**) (160 mg, 0.77 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (**3.6e**) (130 mg, 0.84 mmol, 1.1 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 228 mg (0.63 mmol/ 82%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S; MW: 363; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.03 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J = 8.1$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.13-7.01 (m, 4H), 6.93 (ddd,  $J = 8.0$  Hz, 6.2 Hz, 3.5 Hz, 1H), 6.05 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  173.9 (d,  $J = 3.1$  Hz), 152.5 (d,  $J = 246.9$  Hz), 149.1 (d,  $J = 250.6$  Hz), 148.6 (d,  $J = 10.7$  Hz), 148.1 (d,  $J = 11.0$  Hz), 140.5 (d,  $J = 7.7$  Hz), 137.5 (d,  $J = 3.7$  Hz), 133.2 (d,  $J = 3.8$  Hz), 124.6 (d,  $J = 4.7$  Hz), 120.3 (d,  $J = 2.3$  Hz), 119.8 (d,  $J = 11.0$  Hz), 119.2 (d,  $J = 7.2$  Hz), 116.3 (d,  $J = 18.7$  Hz), 113.1 (d,  $J = 1.9$  Hz), 111.7 (d,  $J = 2.2$  Hz), 73.5, 56.5, 56.4; **MS** (ESI): 364 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanone (4.9a).**



According to **method 4.B** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanol (**4.9b**) (215 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (199 mg, 0.71 mmol, 1.2 eq) for 3 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 140 mg (0.39 mmol/ 65%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S; MW: 361; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.38 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 8.32 (ddd,  $J = 8.5$  Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 8.14 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.27-7.19 (m, 2H), 7.17 (dt,  $J = 8.1$  Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.03 (dt,  $J = 8.1$  Hz, 1.5 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.95 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  182.4 (d,  $J = 0.9$  Hz), 167.0 (d,  $J = 3.3$  Hz), 156.2 (d,  $J = 256.7$  Hz), 149.5 (d,  $J = 252.3$  Hz), 148.7 (d,  $J = 10.7$  Hz), 147.9 (d,  $J = 10.8$  Hz), 143.4 (d,  $J = 7.9$  Hz), 139.6 (d,  $J = 4.1$  Hz), 131.7 (d,  $J = 3.5$  Hz), 125.8 (d,  $J = 8.0$  Hz), 124.9 (d,  $J = 4.7$  Hz), 120.7 (d,  $J = 1.9$  Hz), 119.4 (d,  $J = 10.7$  Hz), 116.1 (d,  $J = 18.9$  Hz), 115.7 (d,  $J = 3.4$  Hz), 114.1 (d,  $J = 2.2$  Hz), 56.6, 56.5; **MS** (ESI): 362 (M+H)<sup>+</sup>.

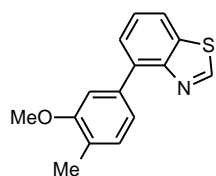
**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanone (4.9).**



According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[5-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanone (**4.9a**) (106 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (2.9 ml, 2.9 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column

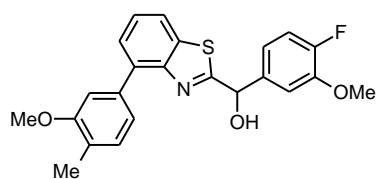
chromatography (dichloromethane/methanole 40:1) to give 83 mg (0.25 mmol, 86%) of the analytically pure compound. C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S; MW: 333; **mp**: 236-237 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  8.48 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.2 Hz, 1H), 8.14 (ddd, *J* = 8.6 Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 7.6 Hz, 6.3 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.14 (dt, *J* = 8.1 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.10 (dt, *J* = 8.1 Hz, 1.8 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  182.6 (d, *J* = 0.9 Hz), 167.9 (d, *J* = 3.7 Hz), 156.1 (d, *J* = 250.9 Hz), 149.3 (d, *J* = 246.3 Hz), 146.8 (d, *J* = 13.1 Hz), 145.8 (d, *J* = 13.2 Hz), 144.1 (d, *J* = 5.8 Hz), 140.0 (d, *J* = 4.4 Hz), 132.8 (d, *J* = 3.5 Hz), 126.1 (d, *J* = 4.5 Hz), 124.9 (d, *J* = 7.8 Hz), 121.4 (d, *J* = 4.6 Hz), 120.4 (d, *J* = 1.7 Hz), 120.0 (d, *J* = 10.9 Hz), 119.8 (d, *J* = 3.5 Hz), 117.0 (d, *J* = 19.3 Hz); **IR**: 3473, 3401, 1599, 1480, 1402, 1294, 775, 749 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 334 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 12.53 min; peak area, 98.5%, HPLC-method A.

#### 4-(3-Methoxy-4-methylphenyl)-1,3-benzothiazole (4.12c).

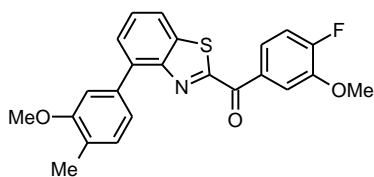


According to **method 4.D1** the title compound was prepared by reaction of 4-bromo-1,3-benzothiazole (4.12d) (258 mg, 1.20 mmol, 1.0 eq) with 3-methoxy-4-methylphenylboronic acid (241 mg, 1.45 mmol, 1.2 eq) in DME/water (15.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 234 mg (0.92 mmol/ 76%) of the analytically pure compound. C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>NOS; MW: 255; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.02 (s, 1H), 7.95 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 7.4 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.32-7.25 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 2.30 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  157.6, 153.4, 151.1, 137.7, 137.3, 134.9, 130.6, 126.4, 126.3, 125.7, 121.6, 120.9, 111.6, 55.5, 16.2; **MS** (ESI): 256 (M+H)<sup>+</sup>.

#### (4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(3-methoxy-4-methylphenyl)-1,3-benzothiazol-2-yl]methanol (4.12b).

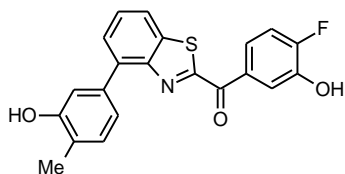


According to **method 4.A** the title compound was prepared by reaction of 4-(3-methoxy-4-methylphenyl)-1,3-benzothiazole (4.12c) (200 mg, 0.78 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (3.6e). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1→7:1→5:1) to give 241 mg (0.59 mmol/ 76%) of the title compound. C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>3</sub>S; MW: 409; **MS** (ESI): 410 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(3-methoxy-4-methylphenyl)-1,3-benzothiazol-2-yl]methanone (4.12a).**

According to **method 4.B** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(3-methoxy-4-methylphenyl)-1,3-benzothiazol-2-yl]methanol (**4.12b**) (241 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (198 mg, 0.71 mmol, 1.2 eq) for 3 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 119 mg (0.29 mmol/ 50%) of the analytically pure compound. C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>FO<sub>3</sub>S; MW: 407;

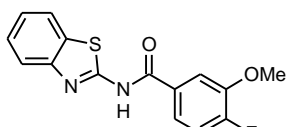
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.43 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 8.35 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J$  = 7.4 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.62 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.36 (d,  $J$  = 1.1 Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J$  = 7.6 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.25 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J$  = 10.6 Hz, 8.6 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 2.32 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  182.7 (d,  $J$  = 1.1 Hz), 166.8, 157.7, 156.4 (d,  $J$  = 257.5 Hz), 151.8, 147.8 (d,  $J$  = 10.7 Hz), 139.3, 138.3, 137.4, 131.5 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 130.5, 128.1, 126.9, 126.8, 125.7 (d,  $J$  = 7.9 Hz), 121.7, 121.1, 116.7 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 116.1 (d,  $J$  = 18.9 Hz), 111.9, 56.1, 55.5, 16.20; MS (ESI): 408 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[4-(3-hydroxy-4-methylphenyl)-1,3-benzothiazol-2-yl]methanone (4.12).**

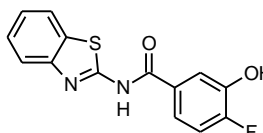
According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[4-(3-methoxy-4-methylphenyl)-1,3-benzothiazol-2-yl]methanone (**4.12b**) (99 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (2.4 ml, 2.4 mmol, 10 eq) in dichloromethane (5.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 6:1) to give 72 mg (0.19 mmol, 79%) of the analytically pure compound. C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>FO<sub>3</sub>S; MW: 379; mp:

228-229 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.14 (s, 1H), 8.38 (ddd,  $J$  = 8.6 Hz, 4.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.21 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.2 Hz, 1H), 8.17 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J$  = 7.5 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.70 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.37 (dd,  $J$  = 7.6 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.6 Hz, 1H), 7.27 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 2.30 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  183.6 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 167.1, 156.2 (d,  $J$  = 251.4 Hz), 156.1, 152.1, 145.9 (d,  $J$  = 13.3 Hz), 139.5, 138.9, 137.8, 132.6 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 131.5, 129.2, 127.4, 125.7 (d,  $J$  = 7.9 Hz), 125.2, 122.0, 121.9, 121.3 (d,  $J$  = 4.5 Hz), 117.0 (d,  $J$  = 19.5 Hz), 116.9, 16.1; IR: 3420, 1647, 1592, 1485, 1430, 1291, 1233, 1118, 775, 754 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 380 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 16.01 .min; peak area, 99.5%, HPLC-method A.

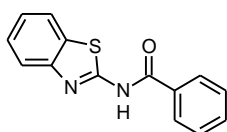


***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (4.17a).**


According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (253 mg, 1.68 mmol, 1.1 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzoic acid (**4.17c**) (260 mg, 1.53 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (15 ml) to give 345 mg (1.14 mmol, 75%) of the analytically pure compound.  $C_{15}H_{11}FN_2O_4S$ ; MW: 302; **mp**: 185-186 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  12.92 (bs, 1H), 8.02 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.98 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.82-7.74 (m, 2H), 7.50-7.44 (m, 1H), 7.41 (dd,  $J$  = 11.0 Hz, 8.6 Hz, 1H), 7.37-7.31 (m, 1H), 3.97 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  164.8, 158.8, 154.2 (d,  $J$  = 251.6 Hz), 148.6, 147.1 (d,  $J$  = 8.6 Hz), 131.4, 128.5, 126.2, 123.7, 121.9 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 121.9 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 120.3, 116.1 (d,  $J$  = 18.9 Hz), 113.8 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 56.2; **IR**: 1599, 1511, 1286, 1261, 763, 749  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 303 (M+H) $^{+}$ .

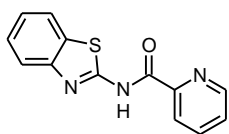
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-hydroxybenzamide (4.17).**


According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (**4.17a**) (93 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.0 ml, 3.0 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) to give 31 mg (0.11 mmol, 36%) of the analytically pure compound.  $C_{14}H_9FN_2O_2S$ ; MW: 288; **mp**: 280-281 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  11.37 (bs, 1H), 9.22 (bs, 1H), 7.99-7.95 (m, 1H), 7.86 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.78 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.3 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.76-7.73 (m, 1H), 7.49-7.42 (m, 1H), 7.37-7.28 (m, 2H); **IR**: 3387, 1698, 1602, 1558, 1517, 1297, 1184, 748  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 289 (M+H) $^{+}$ ; **HPLC** analysis: retention time = 16.82 min; peak area, 97.9%, HPLC-method.

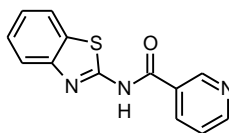
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)benzamide (4.18).**


According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with benzoic acid (**4.18a**) (247 mg, 2.02 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 410 mg (1.61 mmol, 81%) of the analytically pure compound.  $C_{14}H_{10}N_2OS$ ; MW: 254; **mp**: 182-183 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  12.84 (s, 1H), 8.18-8.11 (m, 2H), 8.05-7.99 (m, 1H), 7.81-7.75 (m, 1H), 7.69-7.63 (m, 1H), 7.60-7.53 (m, 2H), 7.50-7.43 (m, 1H), 7.37-7.30 (m, 1H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  166.1, 159.0, 148.3, 133.0, 132.0, 131.5, 128.7, 128.4, 126.3, 123.8, 121.8, 120.4; **IR**: 1672, 1597, 1582, 1292, 1275, 698  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 255 (M+H) $^{+}$ ; **HPLC** analysis: retention time = 18.42 min; peak area, 95.5%, HPLC-method A.

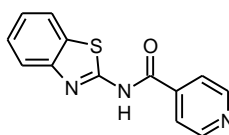


***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)pyridine-2-carboxamide (4.19).**

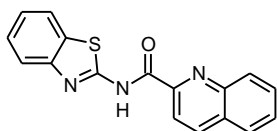
According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with pyridine-2-carboxylic acid (**4.19a**) (246 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 352 mg (1.38 mmol, 69%) of the analytically pure compound. C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>OS; MW: 312; **mp**: 165-166 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  12.16 (bs, 1H), 8.78 (ddd, *J* = 4.7 Hz, 1.7 Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.24-8.20 (m, 1H), 8.15-8.09 (m, 1H), 8.05 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 1.2 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.82 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 1.1 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.75 (ddd, *J* = 7.6 Hz, 4.8 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.48 (ddd, *J* = 8.2 Hz, 7.2 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.36 (ddd, *J* = 8.0 Hz, 7.3 Hz, 1.1 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  163.6, 157.4, 149.1, 148.6, 147.8, 138.4, 131.8, 128.0, 126.3, 124.0, 123.2, 122.0, 120.9; **IR**: 1691, 1529, 1262, 757, 670, 655 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 313 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)pyridine-3-carboxamide (4.20).**

According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with pyridine-3-carboxylic acid (**4.20a**) (246 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was directly purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 1:2) to give 272 mg (1.07 mmol, 53%) of the analytically pure compound. C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>OS; MW: 255; **mp**: 248-249 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  13.11 (bs, 1H), 9.26 (dd, *J* = 2.3 Hz, 0.8 Hz, 1H), 8.81 (dd, *J* = 4.8 Hz, 1.6 Hz, 1H), 8.46 (ddd, *J* = 8.0 Hz, 2.3 Hz, 1.7 Hz, 1H), 8.05-7.99 (m, 1H), 7.82-7.76 (m, 1H), 7.60 (ddd, *J* = 8.0 Hz, 4.8 Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.51-7.44 (m, 1H), 7.39-7.31 (m, 1H); **IR**: 1666, 1598, 1536, 1281, 715 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 256 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)pyridine-4-carboxamide (4.21).**

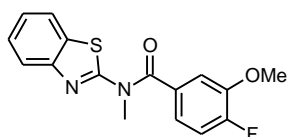
According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with pyridine-4-carboxylic acid (**4.21a**) (246 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 296 mg (1.16 mmol, 58%) of the analytically pure compound. C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>OS; MW: 255; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  13.20 (bs, 1H), 8.85-8.78 (m, 2H), 8.07-7.97 (m, 3H), 7.84-7.75 (m, 1H), 7.53-7.45 (m, 1H), 7.40-7.32 (m, 1H); **MS** (ESI): 256 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)quinoline-2-carboxamide (4.22).**

According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with quinoline-2-carboxylic acid (**4.22a**) (346 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in

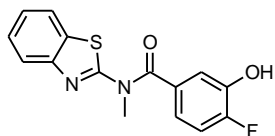
dichloromethane (40 ml) to give 410 mg (1.34 mmol, 67%) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_{11}N_3OS$ ; MW: 305; **mp**: 178-179 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  12.40 (s, 1H), 8.67 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.28 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 6.3 Hz, 1H), 8.14 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 8.06 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 7.94 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 6.9 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.84 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.79 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.9 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.50 (ddd,  $J$  = 9.2 Hz, 5.7 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.40-7.34 (m, 1H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  163.5, 157.4, 148.6, 147.7, 146.0, 138.4, 131.7, 130.9, 129.6, 129.3, 128.9, 128.1, 126.3, 123.9, 121.9, 120.7, 118.8; **IR**: 3324, 1697, 1532  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 306 (M+H) $^+$ .

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxy-*N*-methylbenzamide (4.23a).**



According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (**4.17a**) (242 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with methyl iodide (100  $\mu$ l, 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 151mg (0.48 mmol/ 60 %) of the analytically pure compound.  $C_{16}H_{13}FN_2O_2S$ ; MW: 316; **mp**: 174-175 °C;  $^1H$  NMR (CDCl $_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.04 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 4.7 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.73-7.69 (m, 1H), 7.51-7.46 (m, 1H), 7.38 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.36-7.31 (m, 1H), 7.14 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.4 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.99 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (CDCl $_3$ , 100 MHz):  $\delta$  174.1 (d,  $J$  = 0.9 Hz), 168.0, 155.1 (d,  $J$  = 252.1 Hz), 147.5 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 137.4, 133.3 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 127.2, 126.8, 124.2, 123.1 (d,  $J$  = 7.7 Hz), 123.1, 115.6 (d,  $J$  = 18.7 Hz), 114.4 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 111.4, 56.3, 33.5; **IR**: 1584, 1510, 1463, 1448, 1267, 765, 748  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 317 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 16.18 min; peak area, 99.6%, HPLC-method A.

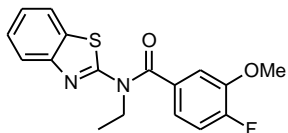
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-*N*-methylbenzamide (4.23).**



According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxy-*N*-methylbenzamide (**4.23a**) (95 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.0 ml, 3.0 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:3) to give 73 mg (0.24 mmol, 80%) of the analytically pure compound.  $C_{15}H_{11}FN_2O_2S$ ; MW: 302; **mp**: 267-368 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.82 (s, 1H), 8.03 (dd,  $J$  = 8.9 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.90 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.86 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.1 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.64 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.58-7.53 (m, 1H), 7.41-7.35 (m, 1H), 7.21 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 4.05 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  173.8 (d,  $J$  = 1.1 Hz), 167.9, 154.7 (d,  $J$  = 247.2 Hz), 145.8 (d,  $J$  = 12.5 Hz), 138.2, 134.2 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 127.8, 126.8, 124.6, 123.4, 121.7 (d,  $J$  = 7.5 Hz), 119.6 (d,  $J$  = 4.3 Hz), 116.2 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 112.8, 32.67; **IR**: 3290, 1563, 1495,

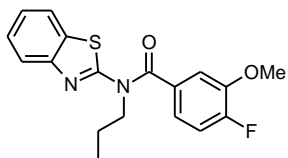
1463, 1429, 769, 747  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 203 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^{+}$ ; **HPLC** analysis: retention time = 18.04 min; peak area, 98.8%, HPLC-method B.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-*N*-ethyl-4-fluoro-3-methoxybenzamide (4.24a).**

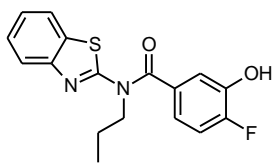


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (**4.17a**) (242 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with ethyl iodide (130  $\mu\text{l}$ , 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 187 mg (0.57 mmol/ 71 %) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ ; MW: 330; **mp**: 145-146  $^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  **NMR** (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.03 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.7 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.72 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.1 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.48 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.38 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 7.4 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.4 Hz, 1H), 4.58 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 1.50 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  **NMR** (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  174.1 (d,  $J$  = 0.9 Hz), 167.1, 155.1 (d,  $J$  = 251.9 Hz), 147.5 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 136.5, 133.4 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 127.2, 127.1, 124.0, 123.2, 123.1 (d,  $J$  = 7.7 Hz), 115.6 (d,  $J$  = 18.8 Hz), 114.4 (d,  $J$  = 2.9 Hz), 111.4, 56.3, 41.0, 12.8; **IR**: 1590, 1510, 1291, 1262, 767, 740  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 331 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^{+}$ ; **HPLC** analysis: retention time = 17.48 min; peak area, 98.9%, HPLC-method A.

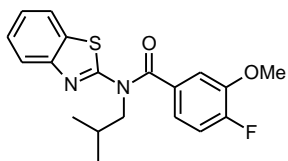
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxy-*N*-propylbenzamide (4.25a).**



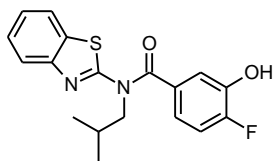
According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (**4.17a**) (242 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu\text{l}$ , 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 12:1) to give 180 mg (0.52 mmol/ 65 %) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ ; MW: 344; **mp**: 122-123  $^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  **NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.03-7.98 (m, 2H), 7.72 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.2 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.47 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.38 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.32 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 7.3 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.8 Hz, 1H), 4.52-4.46 (m, 2H), 2.02-1.91 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 1.97 (m, 2H), 1.08 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  **NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  174.0 (d,  $J$  = 0.8 Hz), 167.6, 155.1 (d,  $J$  = 252.0 Hz), 147.5 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 136.9, 133.4 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 127.1, 127.1, 123.9, 123.1, 123.0 (d,  $J$  = 7.7 Hz), 115.6 (d,  $J$  = 18.8 Hz), 114.4 (d,  $J$  = 2.9 Hz), 111.6, 56.3, 47.5, 21.2, 11.7; **IR**: 1589, 1488, 1409, 1295, 1284, 1266, 1254, 744  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 345 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^{+}$ ; **HPLC** analysis: retention time = 18.62 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-*N*-propylbenzamide (4.25).**

According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxy-*N*-propylbenzamide (**4.25a**) (103 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.0 ml, 3.0 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 95 mg (0.29 mmol, 96%) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S; MW: 330; **mp**: 208-209 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.88 (bs, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.9 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.89 (ddd, *J* = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.87 (ddd, *J* = 7.6 Hz, 1.2 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.54 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 7.4 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.40-7.34 (m, 1H), 7.21 (dd, *J* = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 4.63-4.57 (m, 2H), 2.03-1.92 (m, 2H), 1.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  174.0, 168.0, 154.9 (d, *J* = 246.3 Hz), 145.4 (d, *J* = 13.3 Hz), 137.8, 134.8 (d, *J* = 3.3 Hz), 128.0, 127.4, 124.7, 123.8, 122.5 (d, *J* = 7.4 Hz), 119.7 (d, *J* = 4.0 Hz), 116.5 (d, *J* = 19.1 Hz), 113.0, 47.9, 21.8, 11.6; **IR**: 3303, 1569, 1491, 1426, 766, 739, 637 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 331 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 15.09 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxy-*N*-(2-methylpropyl)benzamide (4.26a).**

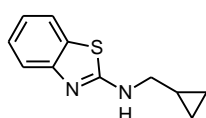
According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (**4.17a**) (181 mg, 0.6 mmol, 1.0 eq) with iodo-2-methylpropane (138  $\mu$ l, 1.2 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 149 mg (0.42 mmol/ 69 %) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S; MW: 358; **mp**: 156-157 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.03-7.95 (m, 2H), 7.72 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 1.2 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.47 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.32 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 7.3 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J* = 11.1 Hz, 8.2 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 2.55-2.40 (m, 1H), 1.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  174.0, 168.0, 155.0 (d, *J* = 248.6 Hz), 147.5 (d, *J* = 10.8 Hz), 137.3, 133.5 (d, *J* = 3.2 Hz), 127.0, 126.9, 123.9, 123.1, 122.9 (d, *J* = 7.7 Hz), 115.7 (d, *J* = 18.8 Hz), 114.4 (d, *J* = 2.9 Hz), 112.0, 56.2, 53.2, 27.9, 20.6; **IR**: 1589, 1511, 1493, 1413, 1291, 768, 744 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 359 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 19.52 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-hydroxy-*N*-(2-methylpropyl)benzamide (4.26).**

According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-3-methoxy-*N*-(2-methylpropyl)benzamide (**4.26a**) (108 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.0 ml, 3.0 mmol, 10 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:2) to give 90 mg (0.26 mmol, 87%)

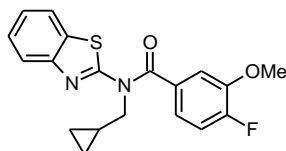
of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S; MW: 344; **mp**: 218-219 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.91 (s, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.9 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.91-7.84 (m, 2H), 7.70-7.65 (m, 1H), 7.56-7.50 (m, 1H), 7.40-7.33 (m, 1H), 7.22 (dd, *J* = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.56-2.41 (m, 1H), 1.06 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H), **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  173.1 (d, *J* = 0.9 Hz), 167.6, 154.0 (d, *J* = 246.5 Hz), 144.6 (d, *J* = 13.1 Hz), 137.3, 134.0 (d, *J* = 3.0 Hz), 127.1, 126.5, 123.9, 122.9, 121.7 (d, *J* = 7.4 Hz), 118.8 (d, *J* = 3.8 Hz), 115.7 (d, *J* = 18.9 Hz), 112.6, 52.5, 27.6, 19.7; **IR**: 3293, 1566, 1490, 1425, 766, 742 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 345 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 16.02 min; peak area, 99.5%, HPLC-method A.

#### ***N*-(Cyclopropylmethyl)-1,3-benzothiazol-2-amine (4.27b).**

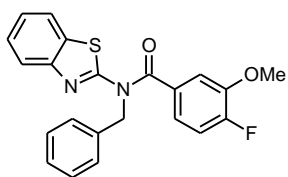


A mixture of 2-chloro-1,3-benzothiazole (4.27c) (339 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq), cyclopropylmethanamine (4.27d) (284 mg, 4.0 mmol, 2.0 eq), potassium carbonate (1.38 g, 10.0 mmol, 5.0 eq) and copper iodide (114mg, 0.6 mmol, 0.3 eq) in dry dimethylsulfoxide (10 ml) was stirred for 48 h at 120 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was cooled down to room temperature, diluted with ethyl acetate and washed with water. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 243 mg (1.18 mmol, 59%) of the title compound. C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S; MW: 204; **MS** (ESI): 205 (M+H)<sup>+</sup>.

#### ***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-*N*-(cyclopropylmethyl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (4.27a).**

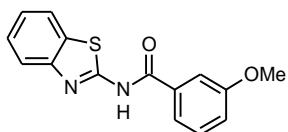


According to **method 4.E2** the title compound was prepared by reaction of 4-fluoro-3-methoxybenzoic acid (4.17c) (170 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) with *N*-(cyclopropylmethyl)-1,3-benzothiazol-2-amine (4.27b) (204 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 12:1) to give 160 mg (0.45 mmol/ 45%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S; MW: 356; **mp**: 114-115 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.88 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 1.2 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.83 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 1.3 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.46 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 7.3 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 10.6 Hz, 8.3 Hz, 1H), 7.09 (ddd, *J* = 8.3 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 4.24 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 1.34-1.22 (m, 1H), 0.48-0.40 (m, 2H), 0.21-0.12 (m, 2H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  170.7, 160.8, 153.9 (d, *J* = 251.9 Hz), 148.5, 148.2 (d, *J* = 11.0 Hz), 133.5, 131.3 (d, *J* = 4.3 Hz), 126.2, 124.4, 121.8, 121.3, 120.7 (d, *J* = 7.6 Hz), 116.4 (d, *J* = 19.2 Hz), 113.3 (d, *J* = 2.7 Hz), 56.5, 54.9, 10.8, 4.3; **IR**: 1565, 1503, 1372, 1243, 762 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 357 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 18.07 min; peak area, 98.5%, HPLC-method A.

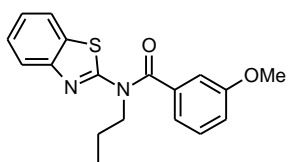
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-*N*-benzyl-4-fluoro-3-methoxybenzamide (4.28a).**


According to **method 4.E2** the title compound was prepared by reaction of 4-fluoro-3-methoxybenzoic acid (**4.17c**) (170 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) with *N*-benzyl-1,3-benzothiazol-2-amine (**4.28b**) (240 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq).

The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1) to give 107 mg (0.27 mmol/ 27%) of the analytically pure compound. C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S; MW: 392; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.85 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 1.3 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.81 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 1.1 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.44 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 7.3 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.34 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.30-7.21 (m, 3H), 7.15-7.06 (m, 3H), 7.03 (ddd, *J* = 8.3 Hz, 4.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.54 (s, 2H), 3.58 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  170.9, 160.2, 153.9 (d, *J* = 252.2 Hz), 148.3, 147.7 (d, *J* = 11.0 Hz), 137.2, 133.7, 130.9 (d, *J* = 4.2 Hz), 128.9, 127.6, 126.8, 126.2, 124.5, 122.0, 121.3, 120.3 (d, *J* = 7.6 Hz), 116.4 (d, *J* = 19.1 Hz), 112.5 (d, *J* = 2.9 Hz), 56.0, 53.5; MS (ESI): 393 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 18.53 .min; peak area, 98.6%, HPLC-method A.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-3-methoxybenzamide (4.29a).**


According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.2 mmol, 1.1 eq) with 3-methoxybenzoic acid (**4.29b**) (304 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 455 mg (1.6 mmol, 80%) of the analytically pure compound. C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S; MW: 284; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  12.87 (bs, 1H), 8.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.76-7.68 (m, 2H), 7.51-7.43 (m, 2H), 7.37-7.30 (m, 1H), 7.24-7.18 (m, 1H), 3.86 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  165.8, 159.3, 159.0, 148.3, 133.2, 131.5, 129.9, 126.3, 123.8, 121.8, 120.7, 120.4, 119.3, 112.8, 55.5; IR: 1671, 1543, 1301, 1267, 743, 724 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 285 (M+H)<sup>+</sup>.

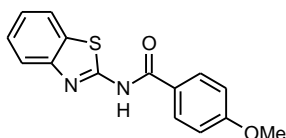
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-3-methoxy-*N*-propylbenzamide (4.29).**


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-3-methoxybenzamide (**4.29a**) (227 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu$ l, 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1  $\rightarrow$  11:1) to give 177 mg (0.54 mmol/ 68 %) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S; MW: 326; mp: 110-111 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.02-7.98 (m, 1H), 7.92 (dd, *J* = 2.7 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.73-7.68 (m, 1H), 7.46 (ddd, *J* = 8.5 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (ddd, *J* = 8.3 Hz, 7.6 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.08 (ddd, *J* = 8.2 Hz, 2.7 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.53-4.47 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.02-1.90 (m, 2H), 1.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  174.9, 167.5, 159.6, 138.3, 136.9,



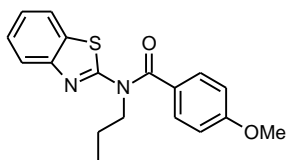
129.2, 127.1, 127.0, 123.8, 123.1, 122.2, 118.6, 113.9, 111.6, 55.5, 47.5, 21.2, 11.7; **IR**: 1600, 1572, 1485, 1468, 1457, 1431, 1278, 1205, 740  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 327 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 18.25 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-methoxybenzamide (4.30a).**



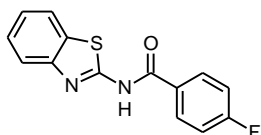
According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with 4-methoxybenzoic acid (**4.30b**) (304 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 474 mg (1.67 mmol, 83%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ; MW: 284; **mp**: 172-173  $^{\circ}\text{C}$ ;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  12.86 (bs, 1H), 8.19-8.11 (m, 2H), 8.03-7.95 (m, 1H), 7.80-7.73 (m, 1H), 7.49-7.43 (m, 1H), 7.13-7.06 (m, 2H), 3.86 (s, 3H); **MS** (ESI): 285 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-methoxy-*N*-propylbenzamide (4.30).**

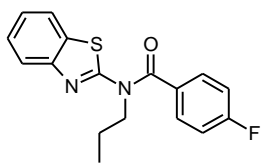


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-methoxybenzamide (**4.30a**) (141 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (170 mg, 1.0 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (2.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1  $\rightarrow$  12:1  $\rightarrow$  9:1) to give 88 mg (0.27 mmol/ 54 %) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ; MW: 326; **mp**: 140-141  $^{\circ}\text{C}$ ;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.36-8.31 (m, 2H), 7.69 (dd,  $J$  = 7.8 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.44 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.36-7.32 (m, 1H), 7.31-7.26 (m, 1H), 7.00-6.94 (m, 2H), 4.52-4.45 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.01-1.89 (m, 2H), 1.07 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  174.7, 167.1, 162.8, 137.0, 131.6, 129.6, 127.2, 126.9, 123.7, 123.1, 113.5, 111.4, 55.5, 47.4, 21.2, 11.7; **IR**: 1602, 1490, 746  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 327 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 17.94 min; peak area, 98.3%, HPLC-method A.

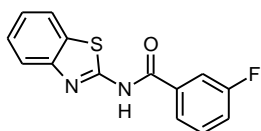
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluorobenzamide (4.31a).**



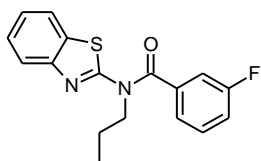
According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with 4-fluorobenzoic acid (**4.31b**) (280 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 428 mg (1.57 mmol, 79%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{FN}_2\text{OS}$ ; MW: 272; **mp**: 207-208  $^{\circ}\text{C}$ ;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  12.90 (bs, 1H), 8.26-8.19 (m, 2H), 8.03-7.98 (m, 1H), 7.81-7.75 (m, 1H), 7.50-7.44 (m, 1H), 7.43-7.37 (m, 2H), 7.36-7.30 (m, 1H); **MS** (ESI): 273 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluoro-*N*-propylbenzamide (4.31).**

According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluorobenzamide (**4.31a**) (218 mg, 0.80 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu$ l, 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 11:1) to give 200 mg (0.64 mmol/ 80 %) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>OS; MW: 314; **mp**: 131-132 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.40-8.34 (m, 2H), 7.70 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 1.2 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.46 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.38-7.35 (m, 1H), 7.30 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 7.3 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.16-7.10 (m, 2H), 4.52-4.45 (m, 2H), 2.01-1.90 (m, 2H), 1.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  174.0, 167.6, 165.4 (d, *J* = 251.8 Hz), 136.9, 133.1 (d, *J* = 2.8 Hz), 132.0 (d, *J* = 9.0 Hz), 127.0, 127.0, 123.9, 123.1, 115.2 (d, *J* = 21.6 Hz), 111.6, 47.5, 21.2, 11.7; **IR**: 1612, 1601, 1486, 1459, 1217, 741 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 315 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 18.93 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

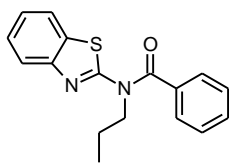
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-4-fluorobenzamide (4.32a).**

According to **method 4.E2** the title compound was prepared by reaction of 1,3-benzothiazol-2-amine (**4.17b**) (330 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with 3-fluorobenzoic acid (**4.32b**) (280 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 416 mg (1.53 mmol, 76%) of the analytically pure compound. C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>OS; MW: 272; **mp**: 166-167 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  12.97 (bs, 1H), 8.05-7.91 (m, 3H), 7.81-7.75 (m, 1H), 7.66-7.58 (m, 1H), 7.55-7.44 (m, 2H), 7.37-7.32 (m, 1H); **IR**: 1673, 1546, 1302, 1285, 1269, 740, 727 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 273 (M+H)<sup>+</sup>.

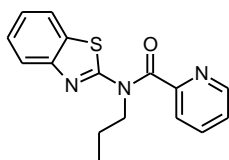
***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-3-fluoro-*N*-propylbenzamide (4.32).**

According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)-4-fluorobenzamide (**4.32a**) (217 mg, 0.80 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu$ l, 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 11:1) to give 168 mg (0.53 mmol/ 67 %) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>OS; MW: 314; **mp**: 109-110 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.15 (dt, *J* = 7.7 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.04 (ddd, *J* = 9.9 Hz, 2.7 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.73-7.69 (m, 1H), 7.50-7.40 (m, 2H), 7.40-7.35 (m, 1H), 7.34-7.28 (m, 1H), 7.21 (ddt, *J* = 8.3 Hz, 2.7 Hz, 1.0 Hz, 1H), 4.53-4.47 (m, 2H), 2.02-1.89 (m, 2H), 1.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  173.9 (d, *J* = 2.8 Hz), 167.8, 162.8 (d, *J* = 245.3 Hz), 139.3 (d, *J* = 6.9 Hz), 136.9, 129.7 (d, *J* = 7.7 Hz), 127.1, 127.0, 125.2 (d, *J* = 2.8 Hz), 124.0, 123.1, 118.8 (d, *J* = 21.5 Hz), 116.3 (d, *J* = 22.4 Hz), 111.7, 47.5, 21.2, 11.7; **IR**: 1602, 1577, 1490, 1458, 1433, 719 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 315 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 19.13 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

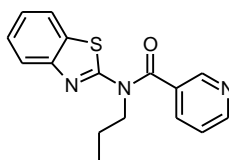


***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-*N*-propylbenzamide (4.33).**


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)benzamide (**4.18**) (203 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu$ l, 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 13:1) to give 164 mg (0.55 mmol/ 69%) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_{16}N_2OS$ ; MW: 296; **mp**: 111-112  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.41-8.35 (m, 2H), 7.71 (ddd,  $J = 7.8$  Hz, 1.2 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.55-7.46 (m, 3H), 7.45 (dd,  $J = 7.3$  Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.39-7.35 (m, 1H), 7.30 (ddd,  $J = 7.8$  Hz, 7.3 Hz, 1.1 Hz, 1H), 4.54-4.47 (m, 2H), 2.03-1.90 (m, 2H), 1.08 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  175.1, 167.5, 136.9, 136.8, 132.0, 129.6, 128.2, 127.1, 127.0, 123.8, 123.1, 111.6, 47.5, 21.2, 11.7; **IR**: 1600, 1568, 1480, 1456, 1432, 1282, 739, 704, 679  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 297 ( $M+H$ ) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 18.33 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-*N*-propylpyridine-2-carboxamide (4.34).**


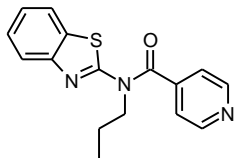
According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)pyridine-2-carboxamide (**4.19**) (204 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu$ l, 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 1:2) to give 96 mg (0.32 mmol/ 40%) of the analytically pure compound.  $C_{16}H_{15}N_3OS$ ; MW: 297; **mp**: 106-107  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.77-8.73 (m, 1H), 8.39-8.35 (m, 1H), 8.02-7.93 (m, 2H), 7.77 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.59-7.52 (m, 2H), 7.42-7.35 (m, 1H), 4.56 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 0.96 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $DMSO-d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  172.6, 167.2, 152.8, 149.6, 136.9, 136.2, 127.3, 125.9, 125.5, 124.5, 124.0, 123.2, 112.7, 46.8, 20.6, 11.1; **IR**: 1623, 1583, 1487, 1470, 1459, 1446, 1382, 746, 725  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 298 ( $M+H$ ) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 12.65 min; peak area, 99.9%, HPLC-method B.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-*N*-propylpyridine-3-carboxamide (4.35).**


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)pyridine-3-carboxamide (**4.20**) (204 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu$ l, 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 1:2) to give 176 mg (0.59 mmol/ 74%) of the analytically pure compound.  $C_{16}H_{15}N_3OS$ ; MW: 297; **mp**: 111-112  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9.40 (dd,  $J = 2.1$  Hz, 0.8 Hz, 1H), 8.75 (dd,  $J = 4.8$  Hz, 1.8 Hz, 1H), 8.54-8.48 (m, 1H), 7.95 (dd,  $J = 7.9$  Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.78 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.59-7.51 (m, 2H), 7.41-7.34 (m, 1H), 4.60-4.48 (m, 2H), 1.94-1.79 (m, 2H), 0.98 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $DMSO-d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  172.3, 166.9, 152.5, 150.3, 136.5, 136.4,

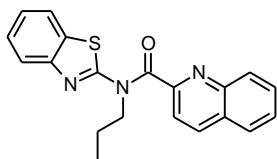
131.6, 127.4, 125.7, 124.2, 123.7, 123.2, 112.8, 46.9, 20.7, 11.2; **IR**: 1610, 1496, 744  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 298 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 13.32 min; peak area, 99.9%, HPLC-method B.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-*N*-propylpyridine-4-carboxamide (4.36).**

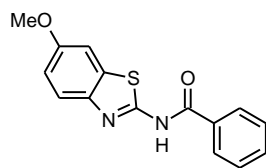


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)pyridine-4-carboxamide (**4.21**) (128 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (100  $\mu\text{l}$ , 1.00 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (3.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 1:2) to give 101 mg (0.34 mmol/ 68%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$ ; MW: 297; **mp**: 129-130  $^{\circ}\text{C}$ ;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.82-8.76 (m, 2H), 8.18-8.14 (m, 2H), 7.78-7.73 (m, 1H), 7.51 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 7.3 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.45-7.41 (m, 1H), 7.36 (dt,  $J$  = 7.9 Hz, 1.1 Hz, 1H), 4.56-4.48 (m, 2H), 2.03-1.92 (m, 2H), 1.09 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  173.4, 168.3, 150.3, 143.9, 136.7, 127.3, 126.9, 124.3, 123.2, 123.0, 111.9, 47.6, 21.3, 11.7; **IR**: 1612, 1497, 1486, 1361, 1288, 746  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 298 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 13.29 min; peak area, 99.9%, HPLC-method B.

***N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-*N*-propylquinoline-2-carboxamide (4.37).**

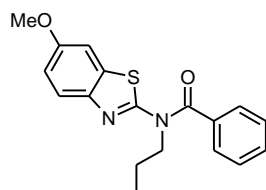


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)quinoline-2-carboxamide (**4.22**) (244 mg, 0.8 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu\text{l}$ , 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:3 $\rightarrow$ 2:1) to give 180 mg (0.52 mmol/ 65%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{OS}$ ; MW: 347; **mp**: 211-212  $^{\circ}\text{C}$ ;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.55 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.48 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 8.07 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.00 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.88-7.79 (m, 2H), 7.73-7.68 (m, 1H), 7.61-7.55 (m, 1H), 7.44-7.39 (m, 1H), 4.67-4.57 (m, 2H), 1.99-1.83 (m, 2H), 1.00 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  173.5, 168.8, 153.8, 147.9, 137.0, 136.8, 131.0, 129.9, 129.0, 127.9, 127.5, 127.4, 127.1, 124.1, 123.2, 121.5, 111.9, 47.7, 21.4, 11.7; **IR**: 1609, 1489, 1472, 1458, 777, 753  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 348 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 15.06 min; peak area, 99.9%, HPLC-method B.

***N*-(6-Methoxy-1,3-benzothiazol-2-yl)benzamide (4.38b).**


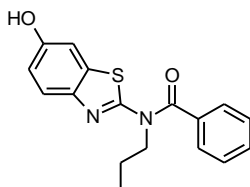
According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 6-methoxy-1,3-benzothiazol-2-amine (**4.38c**) (397 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with benzoic acid (**4.18a**) (244 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 411 mg (1.45 mmol, 72%) of the analytically pure compound.

$C_{15}H_{12}N_2O_2S$ ; MW: 284;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  12.73 (bs, 1H), 8.16-8.10 (m, 2H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.67-7.62 (m, 1H), 7.62-7.59 (m, 1H), 7.59-7.53 (m, 2H), 7.08-7.03 (m, 1H), 3.83 (s, 3H); IR: 1669, 1604, 1555, 1474, 1300, 697  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 285 (M+H) $^+$ .

***N*-(6-Methoxy-1,3-benzothiazol-2-yl)-*N*-propylbenzamide (4.38a).**


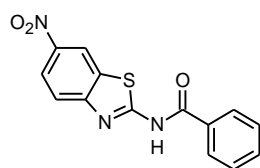
According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(6-methoxy-1,3-benzothiazol-2-yl)benzamide (**4.38b**) (227 mg, 0.80 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (160  $\mu$ l, 1.6 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (4.5 ml). The crude product was purified by column chromatography

(cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 148 mg (0.45 mmol/ 57 %) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{18}N_2O_2S$ ; MW: 326;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.28-8.23 (m, 2H), 7.69-7.63 (m, 1H), 7.60-7.48 (m, 4H), 7.15-7.09 (m, 1H), 4.51 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.93-1.78 (m, 2H), 0.96 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  173.2, 166.0, 156.3, 136.4, 131.9, 130.3, 128.9, 128.3, 127.1, 114.9, 113.3, 107.0, 55.8, 46.9, 20.7, 11.1; MS (ESI): 327 (M+H) $^+$ .

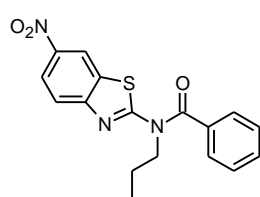
***N*-(6-Hydroxy-1,3-benzothiazol-2-yl)-*N*-propylbenzamide (4.38).**


According to **method 4.C** the title compound was prepared by reaction of *N*-(6-methoxy-1,3-benzothiazol-2-yl)-*N*-propylbenzamide (**4.38a**) (106 mg, 0.32 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.6 ml, 1.6 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column

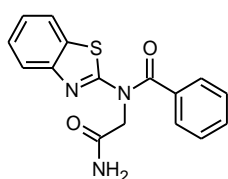
chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 82 mg (0.26 mmol, 82%) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_{16}N_2O_2S$ ; MW: 312; mp: 221-223  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9.71 (s, 1H), 8.27-8.22 (m, 2H), 7.59-7.47 (m, 4H), 7.28 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 4.48 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 1.91-1.79 (m, 2H), 0.97 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  173.1, 165.8, 154.5, 136.6, 131.9, 129.2, 128.9, 128.3, 127.1, 115.5, 113.4, 108.6, 46.9, 20.8, 11.2; IR: 1592, 1478, 1368, 1357, 1213, 715  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 313 (M+H) $^+$ ; HPLC analysis: retention time = 14.66 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

***N*-(6-nitro-1,3-benzothiazol-2-yl)benzamide (4.39b).**


According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of 6-nitro-1,3-benzothiazol-2-amine (**4.39c**) (430 mg, 2.20 mmol, 1.1 eq) with benzoic acid (**4.18a**) (244 mg, 2.00 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (40 ml) to give 386 mg (1.29 mmol, 65%) of the title compound containing residual amine starting material. The crude product was used in the next step without further purification.  $C_{14}H_9N_3O_3S$ ; MW: 299;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  13.25 (bs, 1H), 9.09-9.05 (m, 1H), 8.32-8.26 (m, 1H); 8.18-8.12 (m, 2H), 7.95-7.89 (m, 1H), 7.72-7.65 (m, 1H), 7.61-7.55 (m, 2H); **MS** (ESI): 300 (M+H) $^+$ .

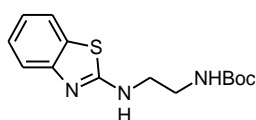
***N*-(6-Nitro-1,3-benzothiazol-2-yl)-*N*-propylbenzamide (4.39a).**


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of previously obtained *N*-(6-nitro-1,3-benzothiazol-2-yl)benzamide (**4.39b**) (386 mg, 1.29 mmol, 1.0 eq) with *n*-propyl iodide (250  $\mu$ l, 2.58 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (6.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 163 mg (0.48 mmol/ 24%, over two steps) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_{15}N_3O_3S$ ; MW: 342;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.97-8.93 (m, 1H), 8.40-8.32 (m, 1H), 8.30-8.23 (m, 2H), 7.98-7.91 (m, 1H), 7.66-7.59 (m, 1H), 7.59-7.51 (m, 2H), 4.64-4.53 (m, 2H), 1.96-1.80 (m, 2H), 1.05-0.92 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  174.2, 168.4, 143.3, 141.7, 135.7, 132.6, 129.2, 128.6, 127.0, 123.0, 119.7, 112.8, 47.4, 20.7, 11.2; **MS** (ESI): 343 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 18.61 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

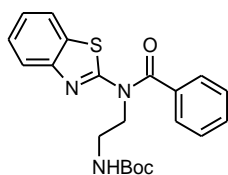
***N*-(2-Amino-2-oxoethyl)-*N*-(1,3-benzothiazol-2-yl)benzamide (4.40).**


According to **method 4.F** the title compound was prepared by reaction of *N*-(1,3-Benzothiazol-2-yl)benzamide (**4.18**) (257 mg, 1.01 mmol, 1.0 eq) with iodoacetamide (373 mg, 2.02 mmol, 2.0 eq) in dimethylformamide (6.0 ml).

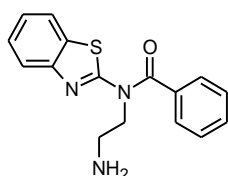
The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 312 mg (1.01 mmol/ quant.) of the analytically pure compound.  $C_{16}H_{13}N_3O_2S$ ; MW: 311; **mp**: 235-236  $^{\circ}C$ ;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.30-8.25 (m, 2H), 7.96-7.91 (m, 1H), 7.91 (bs, 1H), 7.64-7.57 (m, 2H), 7.55-7.48 (m, 3H), 7.40 (bs, 1H), 7.39-7.34 (m, 1H), 5.20 (s, 2H),  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  171.5, 165.6, 165.2, 135.1, 134.1, 130.1, 127.1, 126.3, 125.1, 123.3, 121.9, 121.0, 110.4, 45.5; **IR**: 1672, 1607, 1504, 1487, 1474, 1287, 745, 709  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 312 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 18.42 min; peak area, 95.5%, HPLC-method B.

***tert*-Butyl-[2-(1,3-benzothiazol-2-ylamino)ethyl]carbamate (4.41b).**

A mixture of 2-chloro-1,3-benzothiazole (**4.27c**) (270  $\mu$ l, 2.07 mmol, 2.0 eq), *N*-Boc-ethylenediamine (**4.41c**) (164 mg, 1.02 mmol, 1.0 eq) and potassium carbonate (284 mg, 2.05 mmol, 2.0 eq) in dry dimethylformamide (5.0 ml) was stirred for 5 h at 80 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was cooled down to room temperature and diluted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated sodium bicarbonate and brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 277 mg (0.94 mmol, 92%) of the analytically pure compound. C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S; MW: 293; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.58-7.53 (m, 2H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.14-7.10 (m, 1H), 5.14 (bs, 1H), 3.63-3.60 (m, 2H), 3.47-3.42 (m, 2H), 1.42 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  167.5, 157.0, 151.5, 130.0, 126.2, 122.0, 121.0, 118.7, 80.0, 46.2, 40.3, 28.5; MS (ESI): 294 (M+H)<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl-(2-(*N*-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)benzamido)ethyl)carbamate (4.41a).**

According to **method 4.E1** the title compound was prepared by reaction of *tert*-butyl-[2-(1,3-benzothiazol-2-ylamino)ethyl]carbamate (**4.41b**) (147 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with benzoic acid (**4.18a**) (55 mg, 0.45 mmol, 1.0 eq) in dichloromethane (10 ml) to give 143 mg (0.36 mmol, 80%) of the analytically pure compound. C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S; MW: 397; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.88-7.84 (m, 1H), 7.83 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 1.2 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.58-7.53 (m, 2H), 7.52-7.43 (m, 4H), 7.34 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 7.3 Hz, 1.1 Hz, 1H), 5.00 (bs, 1H), 4.43-4.37 (m, 2H), 3.58-3.45 (m, 2H), 1.35 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  171.9, 155.8, 134.5, 133.3, 131.1, 129.0, 127.6, 126.2, 124.4, 121.7, 121.3, 79.6, 50.1, 39.6, 28.5; MS (ESI): 398 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-(2-Aminoethyl)-*N*-phenyl-1,3-benzothiazole-2-carboxamide trifluoroacetate salt (4.41).**

*tert*-butyl-(2-(*N*-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)benzamido)ethyl)carbamate (**4.41a**) was solved in trifluoroacetic acid (3.6 ml) and stirred at room temperature for 3.5 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 85:15:0.1  $\rightarrow$  40:60:0.1 in 120 min) to give 112 mg (0.27 mmol/ 76%) of the analytically pure compound. C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OS·TFA; MW: 411; mp: 136-137 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.97-7.90 (m, 2H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.57-7.41 (m, 5H), 7.34-7.29 (m, 1H), 3.98-3.87 (m, 2H), 3.68-3.56 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  170.1, 168.3, 138.3, 133.1, 132.2, 128.8, 128.6, 127.4, 124.8, 122.4, 122.2, 114.7, 47.6, 38.5; IR: 1665, 1636, 1185, 1139, 710 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 298 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 11.46 min; peak area, 99.9%, HPLC-method B.

#### 4.12.1 Inhibition of 17 $\beta$ -HSD14

Inhibitory activities were evaluated with a fluorimetric assay as previously described in chapter 3 (Kapitel 3).

#### 4.12.2 MOE models of compounds 4.8, 4.9, 4.12, 4.13 and 4.16

The inhibitors 4.8, 4.9, 4.12, 4.13 and 4.16 were model inside the crystal structure of 3.21 in complex with the protein (PDB 5ICM)<sup>14</sup> and minimized with MOE.<sup>8</sup> During the minimization, the AMBER12 force-field was applied. The 3-OH group at the C-ring of the inhibitors and the heavy atom of the protein were fixed. In order to give to the ligand freedom to move also the residues His93, Gln148 and Met were allowed to move during minimization.

## 4.13 Referenzen

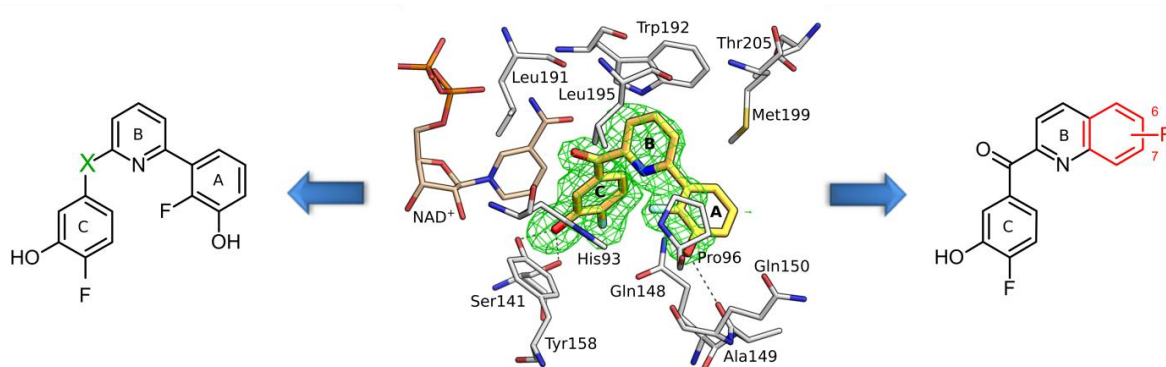
- (1) Spadaro, A.; Frotscher, M.; Hartmann, R. W. Optimization of Hydroxybenzothiazoles as Novel Potent and Selective Inhibitors of 17 $\beta$ -HSD1. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2469–2473.
- (2) Oster, A.; Hinsberger, S.; Werth, R.; Marchais-Oberwinkler, S.; Frotscher, M.; Hartmann, R. W. Bicyclic Substituted Hydroxyphenylmethanones as Novel Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17 $\beta$ -HSD1) for the Treatment of Estrogen-Dependent Diseases. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8176–8186.
- (3) Braun, F.; Bertolotti, N.; Möller, G.; Adamski, J.; Steinmetzer, T.; Salah, M.; Abdelsamie, A. S.; van Koppen, C. J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. First Structure–Activity Relationship of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14 Nonsteroidal Inhibitors and Crystal Structures in Complex with the Enzyme. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10719–10737.
- (4) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.
- (5) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, 2000.
- (6) Morrison, J. F. The Slow-Binding and Slow, Tight-Binding Inhibition of Enzyme-Catalysed Reactions. *Trends Biochem. Sci.* **1982**, *7*, 102–105.
- (7) Morrison, J. F. Kinetics of the Reversible Inhibition of Enzyme-Catalysed Reactions by Tight-Binding Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *185*, 269–286.
- (8) Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite 910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2016.
- (9) Toulot, S.; Heinrich, T.; Leroux, F. R. Convenient and Reliable Routes Towards 2-Aminothiazoles: Palladium-Catalyzed versus Copper-Catalyzed Aminations of Halothiazoles. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 3263–3272.
- (10) Donthiri, R. R.; Pappula, V.; Chandra Mohan, D.; Gaywala, H. H.; Adimurthy, S. Sodium Hydroxide Catalyzed N-Alkylation of (Hetero) Aromatic Primary Amines and N1,C5-Dialkylation of 4-Phenyl-2-Aminothiazoles with Benzyl Alcohols. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6775–6781.
- (11) Ouyang, L.; Huang, Y.; Zhao, Y.; He, G.; Xie, Y.; Liu, J.; He, J.; Liu, B.; Wei, Y. Preparation, Antibacterial Evaluation and Preliminary Structure–activity Relationship (SAR) Study of Benzothiazol- and Benzoxazol-2-Amine Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3044–3049.
- (12) <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/nad-nadh-glo-assay-protocol.pdf>. 31.07.2017
- (13) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.

- (14) Bertoletti, N.; Braun, F.; Lepage, M.; Möller, G.; Adamski, J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. New Insights into Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14: First Crystal Structures in Complex with a Steroidal Ligand and with a Potent Nonsteroidal Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 6961–6967.



# Strukturbasiertes Design von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren

5



## Anmerkung

Das folgende Kapitel basiert auf einem Manuskript, das in das *Journal of Medicinal Chemistry* eingereicht werden soll.

Der Autor dieser Arbeit hat am Designkonzept der Inhibitoren mitgewirkt, und war für die Planung, Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung aller neuen Verbindungen verantwortlich. Weiterhin hat er an der Durchführung der Aktivitätsassays für das Target 17 $\beta$ -HSD14 gearbeitet und hat das P-gp ATPase Aktivitätsassay durchgeführt. Er war an der Interpretation aller Ergebnisse beteiligt und hat zum Konzipieren und Verfassen des Manuskripts beigetragen.

## 5.1 Einleitung

In **Kapitel 3** wurde die Identifikation der ersten nichtsteroidalen 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren vorgestellt. Mit Hilfe der Kristallstrukturen der ternären Komplexe von fünf Verbindungen konnte eine erste Struktur-Wirkungsbeziehung für das Target erstellt werden. Dabei wurde festgestellt, dass eine azide Phenolgruppe für die Liganden essentiell ist, um eine starke inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 aufzeigen zu können. Eine starke H-Brückenbindung zur katalytischen Triade des Proteins konnte als maßgeblich ausgemacht werden. Das Pyridinketon **3.8** konnte als hochpotenter 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitor identifiziert werden ( $K_i = 13$  nM), für das weiterhin ein gutes Selektivitätsprofil gegenüber den 17 $\beta$ -HSD Subtypen 1 und 2 beschrieben wurde. Weiterhin konnten für den Inhibitor gute physikochemische Eigenschaften bestimmt werden, die eine vielversprechende Bioverfügbarkeit dieser Verbindung vorhersagen ließen.

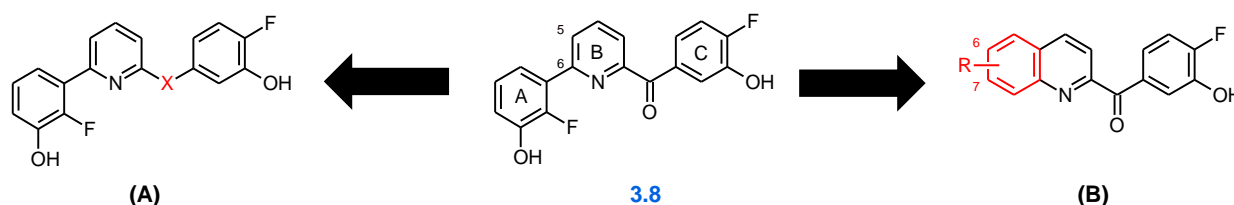
Das Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Arbeit war es Verbindung **3.8** in einem strukturbasierten Ansatz zu modifizieren. Die im Folgenden vorgestellten bezüglich ihrer biologischen und physikochemischen Eigenschaften vielversprechendsten Inhibitoren sollten im weiteren Verlauf dieses Projekts als *in vivo tool compounds* zur Aufklärung der physiologischen Rolle von 17 $\beta$ -HSD14 dienen. Weitere Interaktionen der entworfenen Liganden mit der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 wurden angestrebt, um die Affinität zum Enzym zu optimieren. Der Entwurf unterschiedlicher Strukturgerüste hatte das Ziel verschiedene pharmakokinetische Eigenschaften der potentiellen Inhibitoren hervorzubringen. Ferner wurde ein besonderes Augenmerk auf den Erhalt des guten Selektivitätsprofils von Verbindung **3.8** gegenüber den Subtypen 1 und 2 gelegt.

Das Design, die Synthese und die biologische Evaluation von vorrangig hochaktiven Verbindungen werden im Folgenden beschrieben. Zusätzlich konnten Kristallstrukturen von sieben Inhibitoren im Komplex mit dem Protein erhalten werden, die von Vorteil sind, um die Struktur-Wirkungsbeziehung der erhaltenen Inhibitoren genauer zu fassen und um eine weitere Optimierung der Inhibitoren zu erleichtern. Die Analyse der Kristallstrukturen offenbart einen neuen Bindungsmodus für einen der dargestellten Inhibitoren in der aktiven Tasche des Enzyms. Die Selektivitätsdiskriminierung gegenüber den 17 $\beta$ -HSD Subtypen 1 und 2 und dem nahe verwandten Subtypen 10 wird beschrieben, als auch die *in silico* Berechnung physikochemischer Eigenschaften und die Evaluierung der Löslichkeit der neuen Inhibitoren. Zur weiteren Profilierung der potentesten Inhibitoren wurde deren Zytotoxizität bestimmt. Wie in **Kapitel 1** beschrieben, wird das Enzym unter anderem im Gehirn, der Leber und der Plazenta exprimiert. Das *multi-drug resistance protein* P-gp ist ebenfalls im Gehirn und in der Leber zu finden und spielt eine entscheidende Rolle bei der Bioverfügbarkeit seiner Substrate.<sup>1</sup> Aus diesem Grund wurde eine Untersuchung ausgewählter Inhibitor Kandidaten bezüglich ihres Verhaltens gegenüber dieser Effluxpumpe ebenfalls durchgeführt.

## 5.2 Strukturbasiertes Design

Verbindung **3.8** wurde als Startpunkt gewählt um durch strukturbasierte Modifikationen das Gerüst dieses Inhibitors im Hinblick auf die Bindungsaffinität zu 17 $\beta$ -HSD14 zu verbessern und um entscheidende Interaktionen zwischen dem Protein und seinen potentiellen Liganden verstehen zu können.

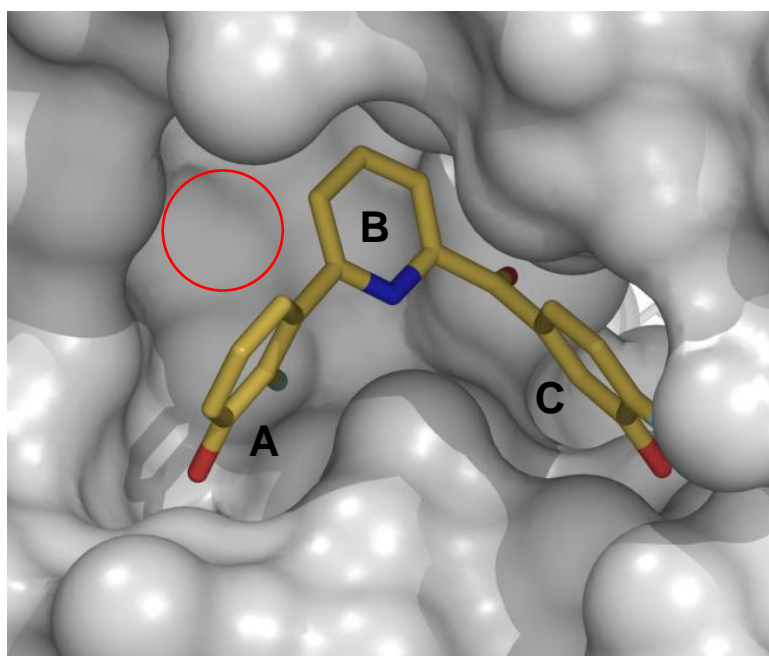
Wie in **Kapitel 3** beschrieben, ist in der Pyridinketonklasse die Interaktion der 3-OH Gruppe am C-Ring mit Tyr154 der katalytischen Triade essentiell, um eine hohe inhibitorische Aktivität zu erreichen. Die Verstärkung der Azidität dieser Hydroxyfunktion wird durch ein in *ortho*-Position lokalisiertes Fluoratom hervorgerufen, das in einem Gewinn an Bindungsaffinität resultiert. Aus diesem Grund wurde das 3-OH/4-F Motiv am C-Ring während der hier vorgestellten Optimierungsprozesse beibehalten.



**Abb. 5.1:** Durchgeführte Modifikationen ausgehend vom Pyridinketon **3.8**.

In einem ersten Optimierungszyklus (**A**) lag zunächst der Fokus auf der Carbonylgruppe des Inhibitors **3.8** (**Abb. 5.1**). Als Verbindungsglied zwischen dem B- und dem C-Ring agierend, kann anhand der Kristallstruktur von **3.8** im ternären Komplex mit dem Protein beobachtet werden, dass diese Funktion für die Ausbildung der V-förmigen Grundstruktur des Inhibitors in der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 verantwortlich ist. Hierdurch wird eine optimale Anpassung an das Protein gewährleistet (**Abb. 5.2**). Dennoch ist in der Kristallstruktur keine direkten Interaktionen zwischen der Carbonylgruppe und den Aminosäuren des Proteins zu identifizieren. Daher war es das erste Ziel die Rolle dieses Verbindungsgliedes zwischen dem B- und dem C-Ring zu untersuchen, indem diese Brücke durch andere Elemente ersetzt wurden. Polare Funktionen, wie eine Ether- oder eine sekundäre Aminogruppe als auch apolare Motive wie ein tertiäres Amin als auch eine Ethenylgruppe wurden eingefügt. Bei dieser Substitution der Carbonylfunktion wurde darauf geachtet, dass die Torsionswinkel der modifizierten Systeme (Winkel zwischen dem B- und dem C-Ring) ähnlich zu denen von Verbindung **3.8** gehalten wurden. Somit sollte eine räumliche Verschiebung des B- und des C-Rings im Vergleich zur Verbindung **3.8** vermieden werden. Ferner wurden Amidbindungen als Verbindungsglieder eingefügt, um die Distanz zwischen den genannten Ringen zu vergrößern, und um die Folgen der dadurch hervorgerufenen Verschiebung des B- und des A-Rings zu untersuchen.

Zusätzlich kann in der beschriebenen Kristallstruktur von **3.8** eine relativ große hydrophobe Tasche in der Nachbarschaft des B-Rings beobachtet werden, die sich in Richtung der Positionen 5 bzw. 6 des Rings befindet (**Abb. 5.2**). Daher war es in einer zweiten Optimierungsrunde (**B**) das Ziel, diese Tasche zu adressieren, indem der Pyridinring erweitert werden sollte. Durch die Fusion des A- und des B-Rings entstanden chinolinartige Inhibitoren. Die weitere Versteifung des Strukturgerüsts der Chinoline im Vergleich zu den pyridinbasierenden Inhibitoren wurde ebenfalls als Vorteil für die inhibitorische Aktivität angenommen.<sup>2</sup> Zusätzlich bestand die Aussicht, durch die mögliche Entdeckung eines neuen Strukturgerüsts den Zugang zu Inhibitoren mit einem abweichenden pharmakokinetischen Profil zu erhalten. Hierzu wurden ebenfalls hydrophile und hydrophobe Substituenten in den Positionen 6 und 7 des Chinolinrings eingeführt, um den chemischen Raum (*chemical space*) dieser Region der Bindetasche von 17 $\beta$ -HSD14 auszuleuchten.



**Abb. 5.2:** Kristallstruktur von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit Cofaktor NAD<sup>+</sup>, und Inhibitor **3.8** (in gelb, PDB ID: 5L7Y). Der Inhibitor ist als Stäbchenmodell dargestellt. Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) verdeutlicht. Die relativ große hydrophobe Tasche in der Nähe des B-Rings ist mit einem roten Ring gekennzeichnet. Alle Strukturen wurden von NICOLE BERTOLETTI mit PyMOL bearbeitet.<sup>3</sup>

#### Pan Assay Interferenz Verbindungen (PAINS)<sup>4</sup>

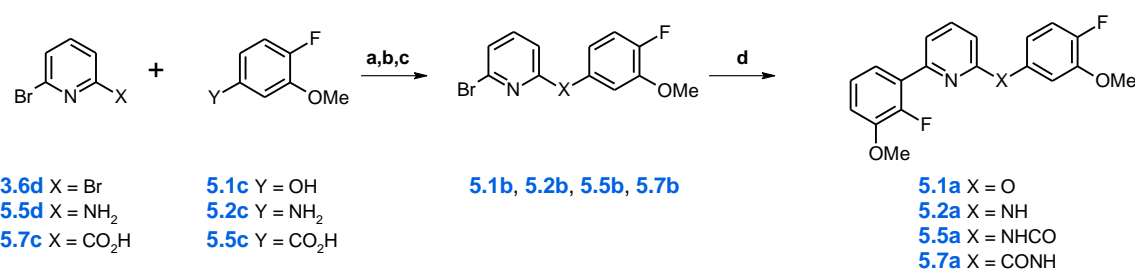
Um Verbindungen zu identifizieren, die unspezifisch zu verschiedenen biologischen Zielstrukturen binden können und somit im Rahmen dieses Projekts zu vermeiden sind, wurden alle entworfenen Verbindungen *in silico* mit Hilfe des „PAINS-remover“ Programms untersucht.<sup>5</sup> Dabei wurden keine dieser Verbindungen als unspezifischer Binder identifiziert.

## 5.3 Synthese

### Synthese der Inhibitoren 5.1-5.7

Die Synthese der Inhibitoren **5.1-5.7** konnte ausgehend von den Pyridinderivaten **3.6d**, **5.5d** und **5.7c** ermöglicht werden. Die Reaktion von 2,6-Dibrompyridin **3.6d** mit dem Phenol **5.1c** und Natriumhydrid als Base lieferte Verbindung **5.1b** mit moderater Ausbeute (26%). Für die Reaktion mit dem Anilinderivat **5.2c** und LHMDs als Base konnte das sekundäre Amin **5.2b** mit Ausbeuten von bis zu 62% erhalten werden. Zur Darstellung der Amide **5.5b** und **5.7b** erfolgte zunächst die Aktivierung der Carbonsäurederivate **5.5c** und **5.7c** mit SOCl<sub>2</sub>, gefolgt von der anschließenden Umsetzung mit der entsprechenden Anilinspezies **5.5d** bzw. **5.2c**. Diese Amidkupplungen waren mit sehr guten Ausbeuten von 77-85% verbunden. SUZUKI-MIYAUURA-Kupplungen<sup>6</sup> der Verbindungen **5.1b**, **5.2b**, **5.5b** und **5.7b** mit 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure lieferte die Verbindungen **5.1a**, **5.2a**, **5.5a** und **5.7a** ebenfalls mit sehr guten Ausbeuten (70-92%, **Schema 5.1**).

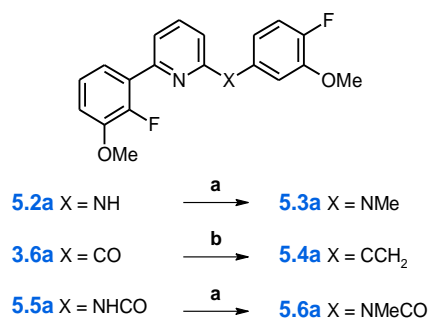
**Schema 5.1:** Synthese der Vorstufen **5.1a**, **5.2a**, **5.5a** und **5.7a**.



Bedingungen: **a)** für **5.1b**: **3.6d**, **5.1c**, NaH, DMF, 100 °C, über Nacht; **b)** für **5.2b**: **3.6d**, **5.2b**, LHMDs, 1,4-Dioxan/THF 1:1, RT, 3 h; **c)** für **5.5b** (**5.5c** + **5.5d**), **5.7b** (**5.2c** + **5.7c**) i) SOCl<sub>2</sub>, DMF, Toluol, 110 °C, 4 h, ii) Et<sub>3</sub>N, DCM, 0 °C → RT, über Nacht; **d)** Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 2-Fluor-3-methoxyphenylboronsäure, DME/H<sub>2</sub>O (2:1), 80 °C, über Nacht.

Verbindungen **5.1a**, **5.2a**, **5.5a** und **5.7a** dienten zunächst als Ausgangsverbindungen zur Darstellung der methylierten Derivate **5.3a** und **5.6a**. Die durchgeführten Methylierungen mit Natriumhydrid als Base und Methyljodid lieferte die gewünschten Zwischenverbindungen in exzellenter bis guter Ausbeute (91 bzw. 61%). Durch eine WITTIG-Olefinierung<sup>7</sup> des in **Kapitel 3** beschriebenen Carbonyls **3.6a** mit Methylphenylphosphoniumbromid (MePh<sub>3</sub>P<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>) konnte zusätzlich die Vorstufe **5.6a** in sehr guter Ausbeute (74%) erhalten werden (**Schema 5.2**).

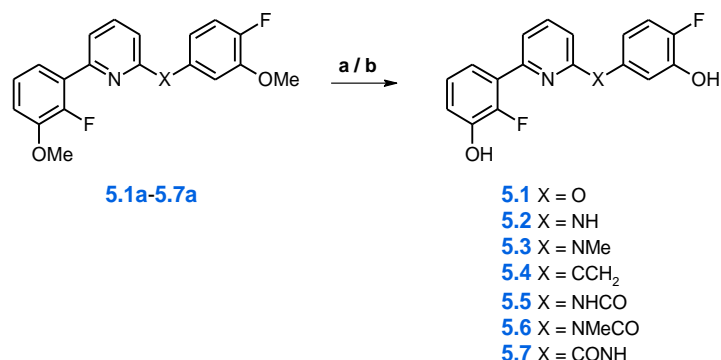
**Schema 5.2:** Synthese der zusätzlichen Vorstufen **5.3a**, **5.4a** und **5.6a**.



Bedingungen: **a)** MePh<sub>3</sub>P<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>, *n*-BuLi, THF, 0 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht; **b)** NaH, MeI, DMF, 0 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht.

Alle Methoxygruppen der Vorstufen **5.1a-5.3a** und **5.5a-5.7a** wurden mit BBr<sub>3</sub> gespalten und lieferte die entsprechenden Endstufen **5.1-5.3** und **5.5-5.7** in moderaten bis guten Ausbeuten (25-67%). Zur Synthese von **5.4** musste ausgehend von **5.4a** BF<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub> eingesetzt werden, um das gewünschte Produkt in annehmbarer Ausbeute (46%) erhalten zu können (**Schema 5.3**).

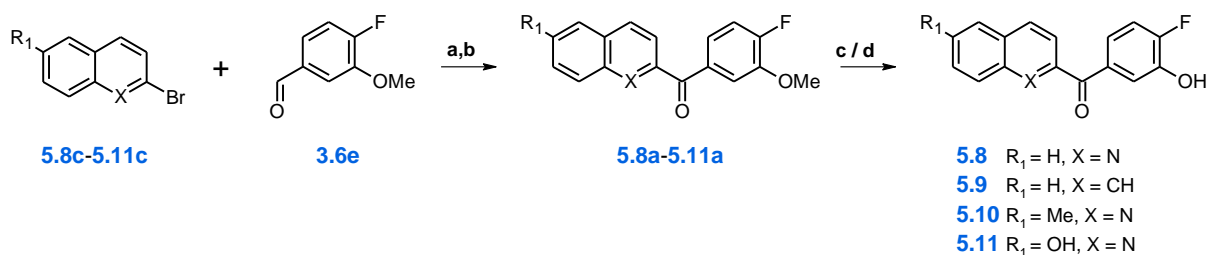
**Schema 5.3:** Synthese der Inhibitoren **5.1-5.7**.



Bedingungen: **a)** für **5.1-5.3**, **5.5-5.7**: BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht; **b)** für **5.4**: BF<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>, DCM, RT, über Nacht.

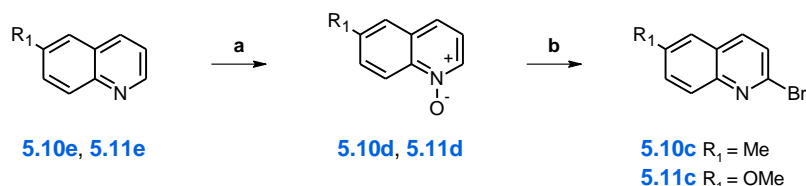
### Synthese der Inhibitoren **5.8-5.11**

Die Synthese der Verbindungen **5.8-5.11** wurde in drei Schritten ausgehend von den 2-Bromchinolinen **5.8c-5.11c** ermöglicht (**Schema 5.4**). Die Lithiierung mit *n*-BuLi und nukleophile Addition an 4-Fluor-3-methoxybenzaldehyd (**3.6e**) lieferte nach der Oxidation der gebildeten Alkohole **5.8b-5.11b** (nicht dargestellt) mit IBX die entsprechenden Chinolinketone **5.8a-5.11a**. Über zwei Stufen konnten dabei akzeptable bis gute Ausbeuten von 31-48% erzielt werden. Alle Methoxygruppen der Vorstufen **5.8a-5.10a** wurden mit BBr<sub>3</sub> gespalten und lieferten die entsprechenden Endstufen **5.8-5.10** in sehr guten bis exzellenten Ausbeuten (82-97%). Für die Darstellung des Inhibitors **5.11** wurde ausgehend von **5.11a** dieses Edukt mit BF<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub> behandelt, um das gewünschte Produkt in annehmbarer Ausbeute (54%) erhalten zu können (**Schema 5.4**).

**Schema 5.4:** Synthese der Inhibitoren **5.8-5.11**.


Bedingungen: **a)** *n*-BuLi, THF<sub>abs.</sub>, -80 °C  $\rightarrow$  RT, 2 h; **b)** IBX, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, 2 h; **c)** für **5.8-5.10**: BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht. **d)** für **5.11**: BF<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>, DCM, RT, über Nacht.

Die Synthese der 2-Bromchinoline **5.10c** und **5.11c** erfolgte ausgehend von den entsprechenden in Position 6 substituierten Chinolinen **5.10e** und **5.11e** nach einer von WENGRYNIUK *et al.*<sup>8</sup> beschriebenen Methode. In der zweistufigen Synthese wurden die Chinolinderivate oxidativ mit *m*-CPBA aktiviert und anschließend mittels Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) in Anwesenheit von *para*-Toluolsulfonsäureanhydrid (*p*-Ts<sub>2</sub>O) bromiert. Dabei war es im zweiten Schritt zwingend notwendig die Reaktionslösung stark zu verdünnen (0.01 M), um die Bildung des in 4-Position bromierten Nebenprodukts zu unterdrücken. Auf diese Weise konnten die gewünschten Vorstufen **5.10c** und **5.11c** mit guten bis sehr guten Ausbeuten (47 bzw. 67%) über zwei Stufen erhalten werden (Schema 5.5).

**Schema 5.5:** Synthese der 2-Bromchinoline **5.10c** und **5.11c**.


Bedingungen: **a)** *m*-CPBA, DCM, 0 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht; **b)** MS 4 Å, TBAB, *p*-Ts<sub>2</sub>O, DCM, RT, über Nacht.

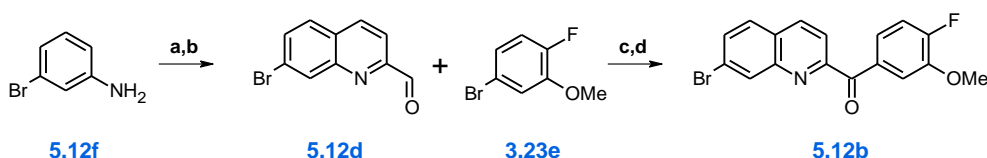
**Synthese der Inhibitoren 5.12-5.16**

Zur Synthese der Inhibitoren **5.12-5.16** wurde zunächst die Vorstufe **5.12b** dargestellt (Schema 5.6), die durch ihren Bromsubstituenten in Position 7 des Chinolinrings ideal geeignet ist, um weitere Modifikationen an dieser Position durchzuführen. Nach einer von PETIT *et al.*<sup>9</sup> beschriebenen Vorschrift wurde 3-Bromanilin **5.12f** in einer DOEBNER-MILLER-Reaktion<sup>10</sup> mit Crotonaldehyd umgesetzt um 7-Brom-2-methylchinolin **5.12e** (nicht aufgeführt) zu erhalten. Der Einsatz von Zinkchlorid ermöglichte es, das ebenfalls in Position 4 methylierte Isomer abzutrennen um das gewünschte Produkt in einer guten Ausbeute von 31% zu erhalten. Die Oxidation mit Selendioxyd lieferte den Aldehyd **5.12d** in exzellenter Ausbeute (96%). Ausgehend vom Arylbromid **3.23e** wurde



das entsprechende GRIGNARD-Reagenz hergestellt und in einer nukleophilen Addition mit **5.12d** umgesetzt. Die Oxidation des gebildeten Alkohols **5.12c** (nicht aufgeführt) mit IBX lieferte die Vorstufe **5.12b** mit einer sehr guten Ausbeute von 77% über zwei Stufen.

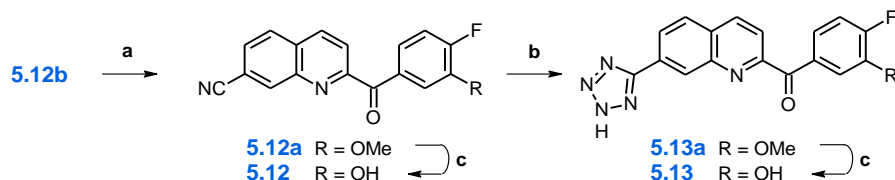
**Schema 5.6:** Synthese der Vorstufe **5.12b**.



Bedingungen: **a)** i) Crotonaldehyd, 5.0 M HCl, 110 °C, 2 h, ii) ZnCl<sub>2</sub>, 5.0 M HCl, 60 °C, 1 h; **b)** SeO<sub>2</sub>, 1,4-Dioxan, 80 °C, 5 h; **c)** Mg, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, 2 h, **3.23e**, 80 °C, 4 h; **d)** IBX, THF<sub>abs.</sub>, 60 °C, über Nacht.

Die Umsetzung von **5.12b** mit Zinkcyanid in einer palladiumkatalysierten Reaktion lieferte das Nitril **5.12a** in quantitativer Ausbeute. Nach einer von ALTERMANN und HALLBERG beschriebenen Methode<sup>11</sup> wurde das Nitril **5.12a** verwendet, um daraus das Tetrazol **5.13a** in einer Mikrowellenreaktion mit Natriumazid zu erhalten. Die Etherspaltungen von **5.12a** und **5.13a** mit BBr<sub>3</sub> lieferte die Inhibitoren **5.12** und **5.13** in guter bis moderater Ausbeute (60% bzw. 39%, **Schema 5.7**).

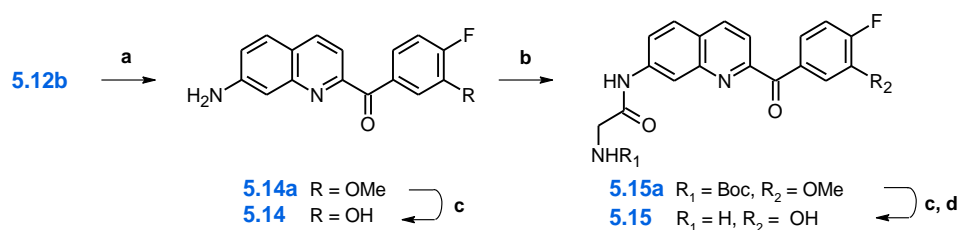
**Schema 5.7:** Synthese der Inhibitoren **5.12** und **5.13**.



Bedingungen: **a)** Zn(CN)<sub>2</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, DMF, 120 °C, 3 h; **b)** NaN<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, DMF,  $\mu$ W, 30 W, 120 °C, 30 min; **c)** BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht.

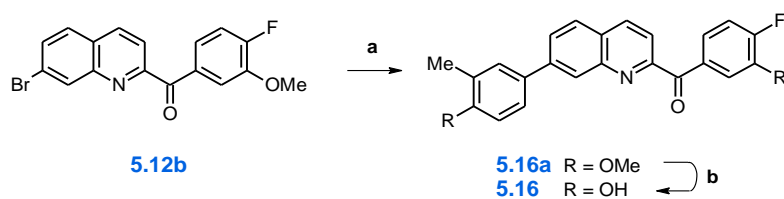
Die Aminierung der Vorstufe **5.12b** wurde nach einer modifizierten Variante der nach ZENG *et al.*<sup>12</sup> beschriebenen kupferkatalysierten Methode durchgeführt. Sie lieferte das Amin **5.14a** in moderater Ausbeute, welches ebenfalls zur Synthese der Vorstufe **5.15a** herangezogen wurde. Hierzu wurde **5.14a** in einer Amidkupplung unter Zuhilfenahme der Kupplungsreagenzien HOBt und EDC·HCl mit Boc-geschütztem Glycin umgesetzt. Verbindung **5.15a** konnte in einer guten Ausbeute von 61% erhalten werden. Alle Methoxygruppen der Verbindungen **5.14a** und **5.15a** wurden mit BBr<sub>3</sub> gespalten. Für **5.15** wurde das erhaltene Rohprodukt zusätzlich mit TFA versetzt, um zum einen eine vollständige Entschützung des Glycinmotivs zu ermöglichen und um zum anderen nach der Aufreinigung mittels präparativer HPLC (TFA in Laufmitteln enthalten) eine stöchiometrische Trifluoracetat-Salzbildung zu gewährleisten (**Schema 5.8**).



**Schema 5.8:** Synthese der Inhibitoren **5.14** und **5.15**.


Bedingungen: **a)** CuI, NH<sub>4</sub>OH, L-Proline, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMSO, 85 °C, 15h; **b)** Boc-Gly-OH, HOBT, EDC·HCl, DIPEA, DCM, 40 °C; **c)** BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht; **d)** TFA, DCM, 1 h, RT.

Die Synthese des Inhibitors **5.16** erfolgte ebenfalls ausgehend von der Vorstufe **5.12b**. Nach einer mit sehr guter Ausbeute (77%) verbundenen SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung<sup>6</sup> mit 4-Methoxy-3-methylphenylboronsäure erfolgte die Entschützung des gebildeten Methoxyderivats **5.16a** mittels BBr<sub>3</sub>. Der gewünschte Inhibitor **5.16** konnte in sehr guter Ausbeute erhalten werden (**Schema 5.9**).

**Schema 5.9:** Synthese des Inhibitors **5.16**.


Bedingungen: **a)** Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 4-Methoxy-3-methylphenylboronsäure, DME/H<sub>2</sub>O (2:1), 80 °C, über Nacht, **b)** BBr<sub>3</sub>, DCM, -80 °C  $\rightarrow$  RT, über Nacht.

## 5.4 Bestimmung physikochemischer Parameter

Vor der Synthese wurden die physikochemischen Eigenschaften der entworfenen Inhibitoren *in silico* mit dem Programm ACD/Percepta (14.0.0) berechnet, um einen Fokus auf die Verbindung legen zu können, die eine gute Bioverfügbarkeit versprochen. Ein Überblick der zugewiesenen Parameter ist in **Tabelle 5.5 (Appendix, Abschnitt 5.13)** gegeben. Die molare Masse wurde für alle Verbindungen in einem Bereich von 250-400 g/mol bestimmt. Der clog*P*, die tPSA Werte, die Anzahl der rotierenden Bindungen sowie die Anzahl an H-Brücken Donoren als auch Akzeptoren erfüllten für alle Inhibitoren die Regeln nach VEBER<sup>13</sup> und die LIPINSKI'S *rules of five*.<sup>14</sup>

Die mögliche Fähigkeit der entworfenen Verbindung die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wurde ebenfalls beachtet, da für 17 $\beta$ -HSD14 beschrieben wurde, dass es unter anderem im Gehirn exprimiert wird.<sup>15</sup> Daher sollten die möglichen Inhibitoren als *tool compounds* in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Speziell für die Pyridine **3.8** und **5.1-5.4** als auch für die Chinoline **5.8**, **5.10**, **5.12** und **5.16** konnten Parameter berechnet werden, die sehr gut mit den von PAJOUHESH and LENZ<sup>16</sup> beschriebenen Eigenschaften übereinstimmen (**Tabelle 5.5, Appendix**).

Der Löslichkeitsbereich aller auf ihre inhibitorische Wirkung hin getesteten Verbindungen wurde nach der in **Kapitel 3** beschriebenen Methode experimentell bestimmt. Dabei konnte für die meisten Verbindungen eine sehr gute Löslichkeit von über 200  $\mu$ M bestimmt werden. Allerdings ergab sich diese für die Verbindungen **5.9**, **5.10** und **5.12** als 25-50  $\mu$ M, und für Verbindung **5.16** als 12.5-25  $\mu$ M. Die erhaltenen Werte sind ebenfalls in **Tabelle 5.5 (Appendix)** zu finden.

## 5.5 Biologische Ergebnisse

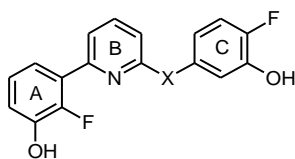
Ein fluoreszenzbasierender Assay wurde, wie in **Kapitel 3** beschrieben, verwendet, um die inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen zu beurteilen. Enzymkonzentrationen zwischen 3.2  $\mu$ M und 3.4  $\mu$ M wurden verwendet. Die Resultate sind als prozentuale Inhibition bei einer Inhibitor Konzentration von 2  $\mu$ M angegeben. Die Inhibitionskonstante  $K_i$  wurde experimentell bei Konzentrationen zwischen 2.6  $\mu$ M und 100  $\mu$ M bzw. 260 nM und 10  $\mu$ M, basierend auf der Potenz der getesteten Inhibitoren, bestimmt. Durch die Verwendung einer ähnlichen Inhibitor- und Proteinkonzentration erfolgte die Auswertung mit Hilfe der quadratischen Gleichung nach MORRISON für „tight binding inhibitors“.<sup>17</sup> Für **5.8a** konnte aufgrund der geringen Löslichkeit kein  $K_i$  ermittelt werden. Die prozentuale Inhibition, bei der höchsten Konzentration bei der der Inhibitor löslich war, wurde daher bestimmt.

### 5.5.1 17 $\beta$ -HSD14 Inhibition

Ausgehend vom Pyridinketon **3.8** wurden im ersten Ansatz die Rolle des Verbindungsgliedes zwischen dem B- und dem C-Ring untersucht. Dabei wurde die Carbonylgruppe der Startverbindung durch verschiedene Baugruppen ersetzt. Ether **5.1** ( $K_i$  = 58 nM), Amin **5.2** ( $K_i$  = 47 nM) und Methylamin **5.3** ( $K_i$  = 42 nM) können als untereinander gleichpotente Liganden identifiziert werden mit einer leicht reduzierten Affinität verglichen zum Inhibitor **3.8** ( $K_i$  = 13 nM). Die Einführung einer Ethenylgruppe resultiert in einer zehnfach potenteren Verbindung **5.4** ( $K_i$  = 1.5 nM), wobei die Anwesenheit eines Amids zu einem Verlust an inhibitorischer Aktivität führt (**5.5**:  $K_i$  = 686 nM, **5.6**:  $K_i$  = 336 nM) und die Einführung eines Methylamids als Verbindungsglied im Vergleich zu Inhibitor **3.8** als unzureichend für die Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 ausgemacht werden kann (**5.7**:  $K_i$  = 2030 nM, **Tabelle 5.1**).

Während des zweiten Ansatzes wurde der B-Ring des Inhibitors **3.8** ( $K_i$  = 13 nM) erweitert. Diese Modifikation führte zu Verbindung **5.8** ( $K_i$  = 12 nM), die sich durch eine vergleichbare Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 auszeichnet. Die Anwesenheit einer 3-OMe Gruppe am C-Ring (**5.8a**: keine Inhibition bei 2  $\mu$ M; 21% Inhibition bei 100  $\mu$ M) führt im Vergleich zum 3-OH Analogon **5.8** (69% Inhibition bei 2  $\mu$ M) zu einem massiven Verlust der inhibitorischen Aktivität. Weiterhin wurde die Rolle des Stickstoffatoms am Chinolinkern untersucht, indem das Naphthalen **5.9** ( $K_i$  = 6 nM) dargestellt wurde, das eine ähnliche Bindung im Vergleich zu **5.8** zum Target aufzeigt (**Tabelle 5.2**).

**Tabelle 5.1:** Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von Pyridinderivaten mit unterschiedlichen Verbindungsgliedern zwischen dem B- und C-Ring.

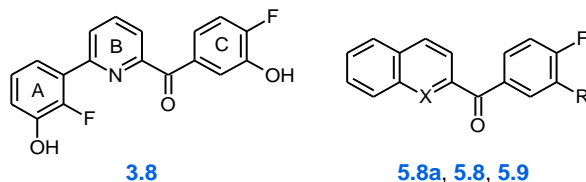


3.8, 5.1-5.7

Verb.	X	17β-HSD14 $K_i$ (nM) <sup>a</sup>
3.8	C=O	13 ± 5
5.1	O	58 ± 12
5.2	NH	47 ± 7
5.3	NMe	42 ± 8
5.4	C=CH <sub>2</sub>	1.5 ± 0.4
5.5	-NHCO-	686 ± 54
5.6	-NMeCO-	2030 ± 180
5.7	-CONH-	336 ± 54

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17β-HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32 μM], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen.

**Tabelle 5.2:** Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von Chinolin- und Naphthalenderivaten.



3.8

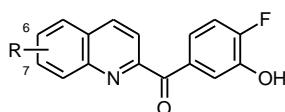
5.8a, 5.8, 5.9

Verb.	X	R	17β-HSD14 $K_i$ (nM) <sup>a</sup>
3.8	-	-	13 ± 5
5.8a	N	OMe	21% @ 100 μM
5.8	N	OH	12 ± 3
5.9	CH	OH	6 ± 2

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17β-HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32 μM], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen.

Im Folgenden wurde Verbindung **5.8** in den Positionen 6 und 7 mit verschiedenen Substituenten funktionalisiert. Mit einer Methylgruppe in Position 6 kann für Verbindung **5.10** kein signifikanter Unterschied bezüglich der inhibitorischen Wirkung, verglichen mit Ausgangsverbindung **5.8**, festgestellt werden (**5.8**:  $K_i = 13$  nM vs. **5.10**:  $K_i = 6$  nM). Eine Hydroxygruppe an gleicher Stelle führt hingegen zu einem zehnfachen Verlust an Affinität zum Protein (**5.11**:  $K_i = 119$  nM). In Position 7 resultiert sowohl die Einführung von neutralen sowie relativ hydrophoben Substituenten (**5.12**:  $K_i = 9$  nM; **5.13**:  $K_i = 6$  nM) als auch von polaren Substituenten (**5.14**:  $K_i = 10$  nM; **5.12**:  $K_i = 34$  nM; **5.13**:  $K_i = 23$  nM) in Inhibitoren mit einer zu **5.8** vergleichbaren Potenz (**Tabelle 5.3**).

**Tabelle 5.3:** Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von 6- und 7-substituierten Chinolinderivaten.



**5.8, 5.10-5.16**

Verb.	R	17 $\beta$ -HSD14 $K_i$ (nM) <sup>a</sup>
<b>5.8</b>	H	12 $\pm$ 3
<b>5.10</b>	6-Me	6 $\pm$ 2
<b>5.11</b>	6-OH	119 $\pm$ 7
<b>5.12</b>	7-CN	9 $\pm$ 1
<b>5.13</b>	7-(tetrazol-5-yl)	10 $\pm$ 2
<b>5.14</b>	7-NH <sub>2</sub>	34 $\pm$ 7
<b>5.15</b>	7-NHGLy	23 $\pm$ 2
<b>5.16</b>	3-Me,4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	6 $\pm$ 2

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen.

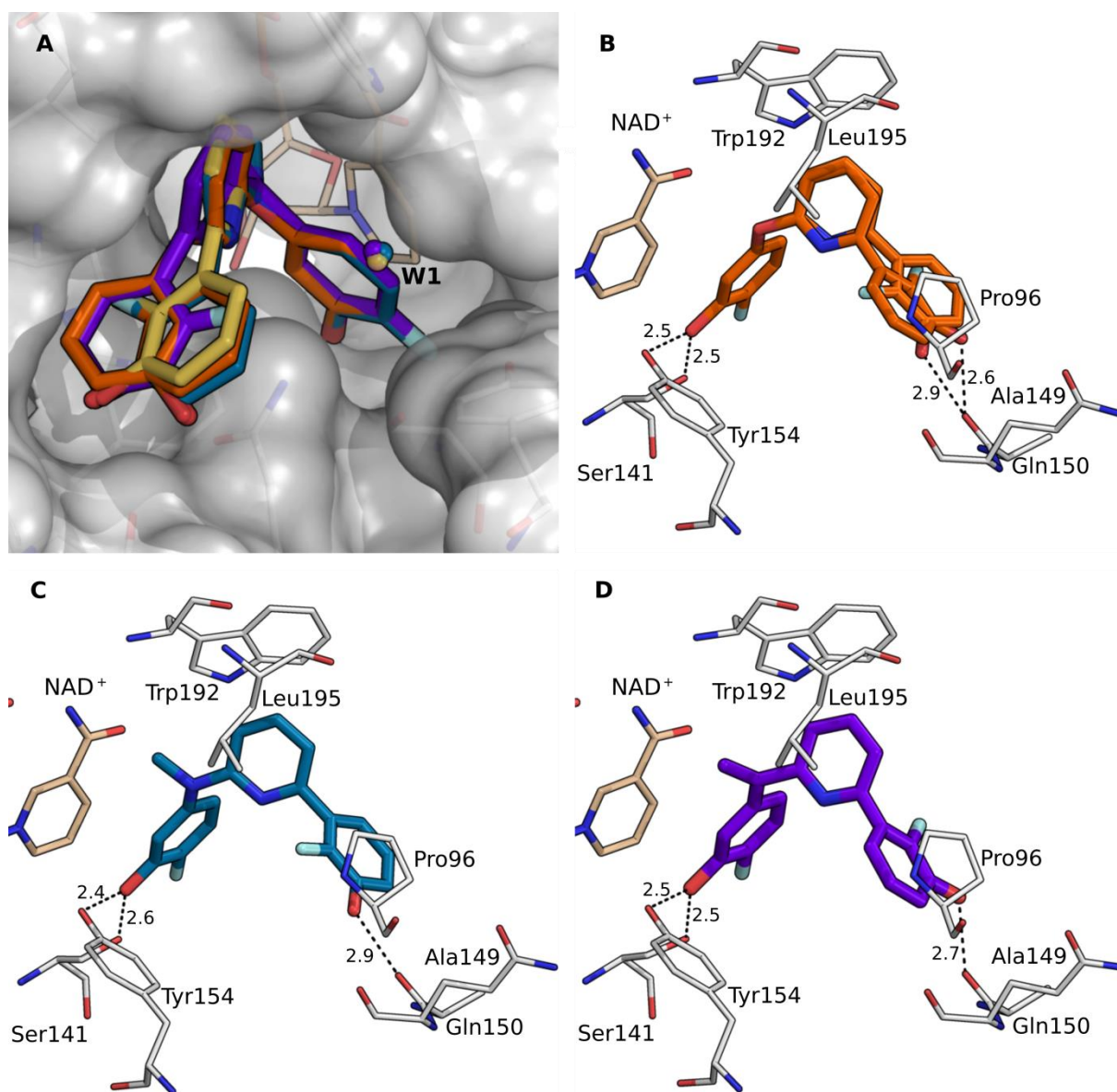
## 5.6 Bestimmung der Kristallstrukturen

Inhibitoren aus beiden Strukturklassen, Pyridine und Chinoline, mit den höchsten Bindungsaffinitäten zu 17 $\beta$ -HSD14 wurden für eine Kristallstrukturanalyse ausgewählt. Dabei konnten durch NICOLE BERTOLETTI sieben Inhibitoren im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14 erhalten werden. Durch Co-Kristallisation wurden Auflösungen von 1.35 bis 1.91 Å für die verschiedenen Strukturen gewährleistet. Die Eigenschaften der Kristalle entsprechen denen die bereits zuvor beschrieben wurden.<sup>18</sup> Die Kristallstrukturen decken auf, dass bereits kleine Änderungen der Inhibitorsubstituenten entscheidende Unterschiede im Bindungsmodus der Liganden hervorrufen können.

Details der Strukturverfeinerung sind in **Tabelle 5.6 (Appendix, Abschnitt 5.13)** beschrieben.

### 5.6.1 Beschreibung der Bindungsmodi der pyridinbasierenden Inhibitoren im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14

Die Überlagerung der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in ternären Komplexen mit den Inhibitoren **5.1**, **5.3** und **5.4** offenbart, dass diese drei Liganden trotz ihrer unterschiedlichen Verbindungsglieder zwischen ihrem B- und C-Ring einen zu Verbindung **3.8** ähnlichen Bindungsmodus in der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 aufzeigen (**Abb. 5.3A**). Für alle drei Inhibitoren ist der C-Ring in enger Nachbarschaft zur katalytischen Triade lokalisiert und ermöglicht enge H-Brückenbindungen über die 3-OH Gruppe am C-Ring zu den Seitenketten von Tyr154 ( $d = 2.4\text{-}2.5$  Å) und Ser141 ( $d = 2.5\text{-}2.6$  Å). Die unterschiedlichen Verbindungsglieder induzieren die gleiche V-förmige Struktur wie sie bereits für Verbindung **3.8** beschrieben wurde. Wie zu erwarten war, ist die Ethergruppe von Inhibitor **5.1** in keine Interaktion mit dem Protein involviert (**Abb. 5.3B**), wohingegen das Methylaminmotiv von Verbindung **5.3** (**Abb. 5.3C**) und die Ethenylgruppe von Verbindung **5.4** (**Abb. 5.3D**) sehr gut in die hydrophobe Tasche passen, die von den Aminosäuren Leu191, Trp192 und Leu195 ausgebildet wird. Scheinbar führt das Ethermotiv als Verbindungsglied zwischen dem B- und dem C-Ring zu einer erhöhten Flexibilität des Liganden, da in der Kristallstruktur eine doppelte Konformation für den Inhibitor **5.1** beobachtet werden kann. Verglichen mit Verbindung **3.8** führt der erstaunlich geringe Unterschied im Winkel zwischen dem B- und dem C-Ring ( $\sim 1^\circ$ ) für das Ethenylmotiv als Verbindungsglied zu einer leichten Verschiebung des B-Rings von Verbindung **5.4** in Richtung von Leu195, was in einer Rotation des A-Rings von ca.  $180^\circ$  resultiert. Die 3-OH Gruppe am A-Ring ist für alle Verbindungen in H-Brückendistanz mit der Carbonylgruppe von Ala149 ( $d = 2.7\text{-}2.9$  Å).

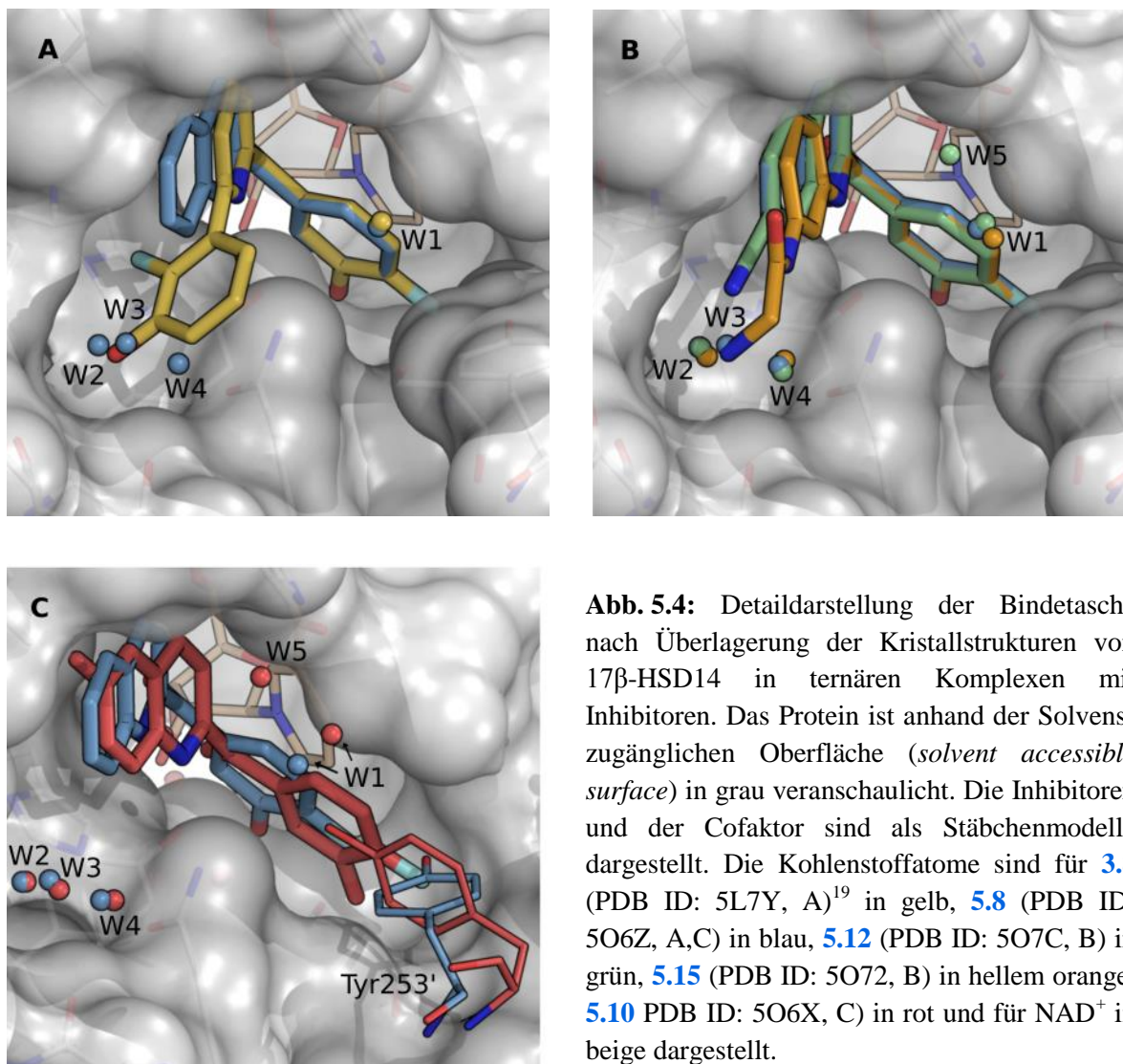


**Abb. 5.3:** Detaildarstellung der Bindetasche nach Überlagerung der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in ternären Komplexen mit den pyridinbasierenden Inhibitoren **3.8** (PDB ID: 5L7Y,<sup>19</sup> **A**), **5.1** (PDB ID: 5O6O, **A** und **B**), **5.3** (PDB ID: 5O43, **A** und **C**) und **5.4** (PDB ID: 5O42, **A** und **D**). Die Kohlenstoffatome sind für **3.8** in gelb, **5.1** in orange, **5.3** in blau, **5.4** in violett und für NAD<sup>+</sup> in beige dargestellt. (**A**) Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) in grau veranschaulicht. Die Inhibitoren und der Cofaktor sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Die Wassermoleküle sind in der gleichen Farbe wie die zugehörigen Inhibitoren der jeweiligen Strukturen wiedergegeben. Die Aminosäuren in einem Abstand von 4.6 Å sind mit dünnen Bindungen dargestellt. (**B**), (**C**) und (**D**) Die Kohlenstoffatome der Aminosäuren sind in weiß beschrieben. H-Brücken sind als gestrichelte Linien mit ihren Längen in Å veranschaulicht.

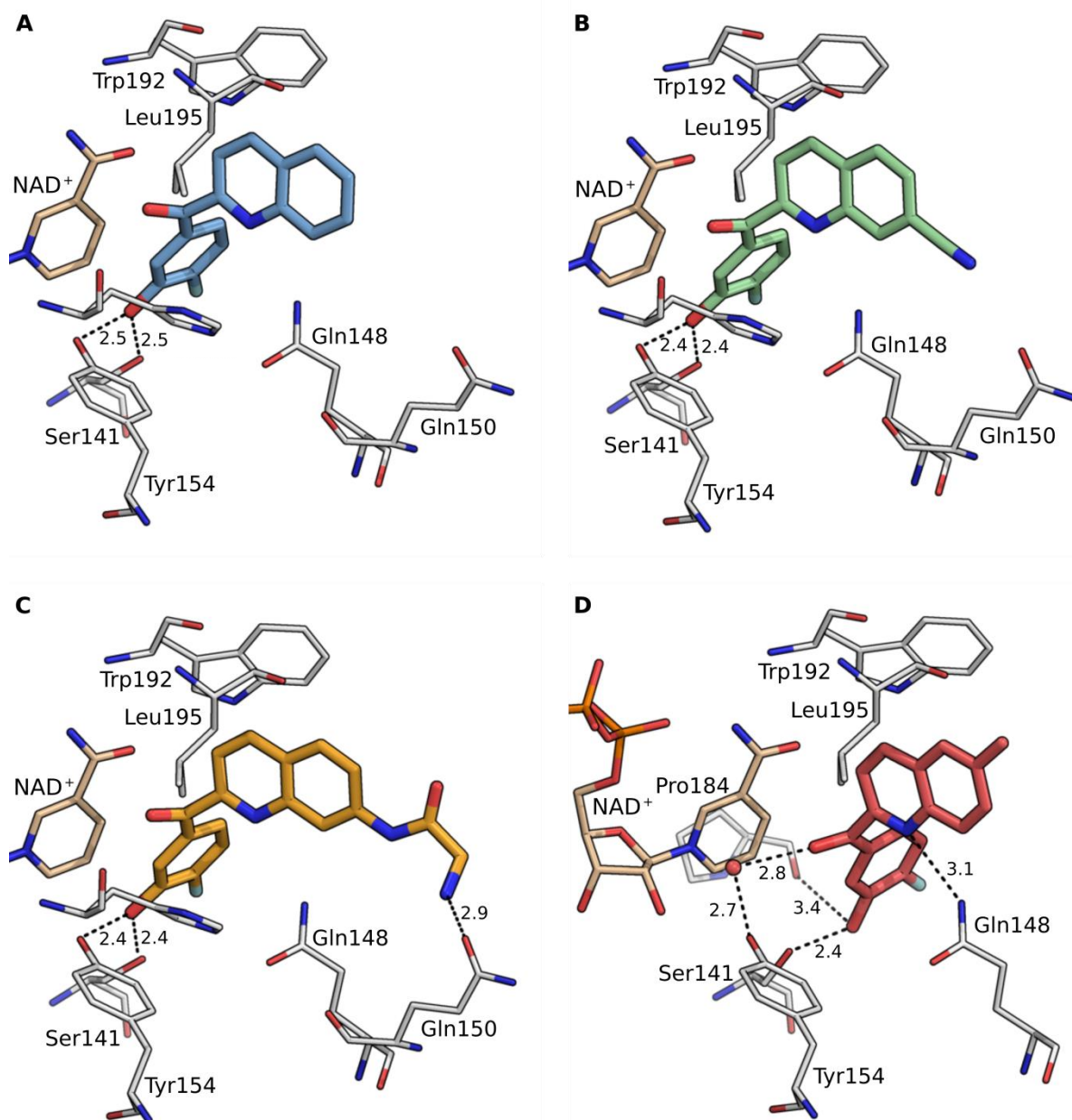


### 5.6.2 Beschreibung der Bindungsmodi von vier chinolinbasierenden Inhibitoren im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14

Der C-Ring der drei Chinolinderivate [5.8](#), [5.12](#) und [5.15](#) ist in der gleichen Region lokalisiert, wie zuvor in der Pyridinketonklasse beobachtet. Die 3-OH Gruppe am C-Ring ermöglicht die gleichen H-Brückeninteraktionen mit Tyr154 ( $d = 2.4\text{--}2.5 \text{ \AA}$ ) und mit Ser141 ( $d = 2.4\text{--}2.5 \text{ \AA}$ ), wie für die zuvor beschriebenen Inhibitoren (**Abb. 5.4A** und **B**, sowie **Abb. 5.5**). Der Chinolinkern adressiert die hydrophobe Region, die von den Aminosäuren Pro95, Pro96, Leu191, Trp192 und Leu195 ausgebildet wird. Die primäre Aminogruppe von Verbindung [5.15](#) ist in einer Distanz zur Carbonylgruppe der Seitenkette von Gln150 ( $d = 2.9 \text{ \AA}$ ), um eine H-Brücke ausbilden zu können. Für Inhibitor [5.12](#) können hingegen keine zusätzlichen Interaktionen im Vergleich zu Verbindung [5.8](#) beobachtet werden (**Abb. 5.5**).







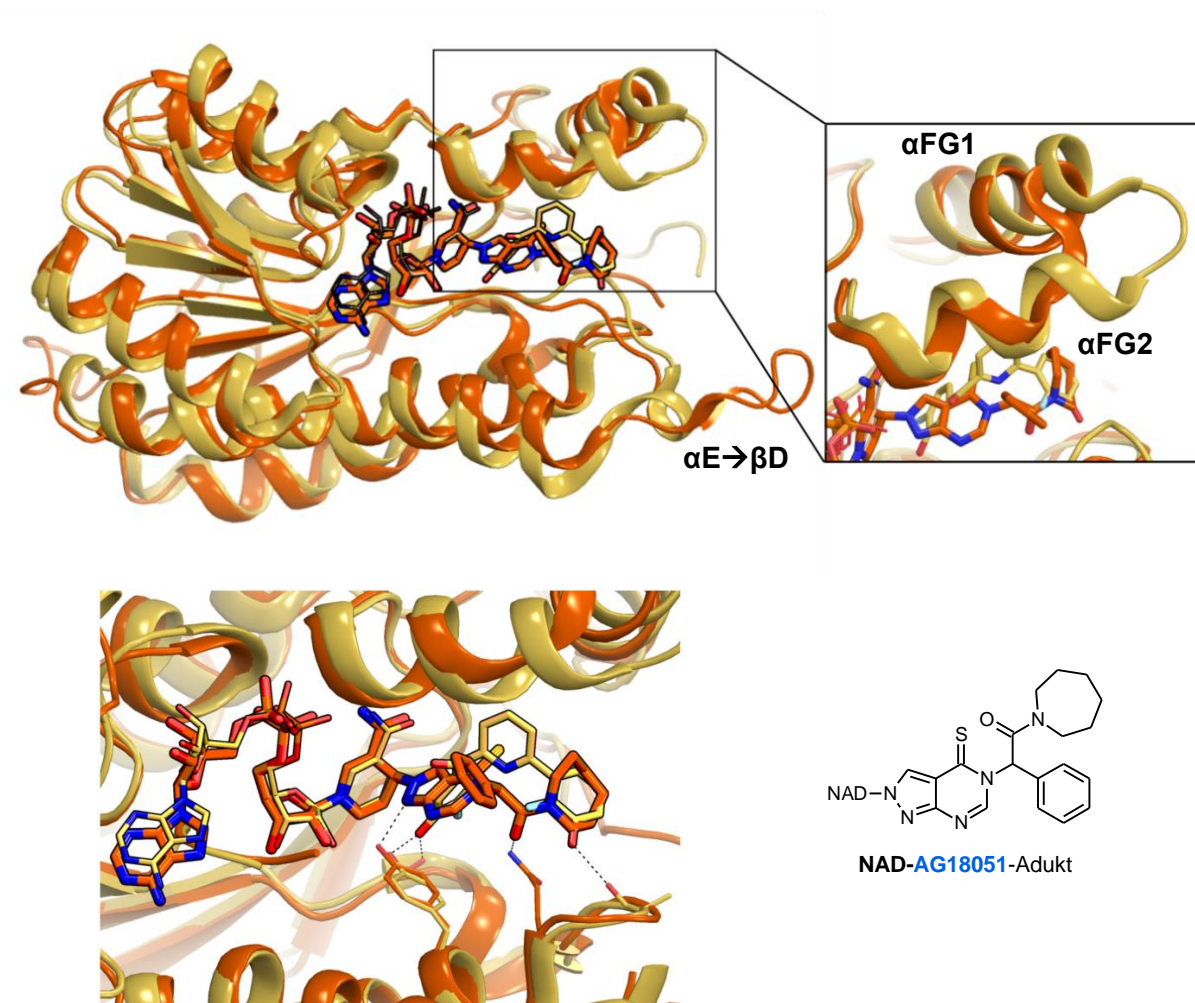
**Abb. 5.5:** Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit Cofaktor NAD<sup>+</sup> und Inhibitoren. Die Kohlenstoffatome sind für **5.8** in blau (**A**), **5.12** in grün (**B**), **5.15** in hellem orange (**C**), **5.10** in rot (**D**) und für NAD<sup>+</sup> beige dargestellt. Die Inhibitoren und der Cofaktor sind als Stäbchenmodelle wiedergegeben. Ausgewählte Aminosäuren sind mit dünnen Bindungen und H-Brücken als gestrichelte Linien mit ihren Längen in Å veranschaulicht.

Verbindung **5.10** ist hervorzuheben, da sie, im Vergleich zu den bisher beschriebenen Strukturen, einen abweichenden Bindungsmodus in der Inhibitorbindetasche von 17 $\beta$ -HSD14 aufweist. Der gesamte Ligand ist tiefer in der aktiven Tasche lokalisiert und verschiebt die Seitenkette von Tyr253' des benachbarten Monomers. Für Liganden wie Verbindung **5.8** ist dieses Tyr seitlich zu den Inhibitoren lokalisiert (in blau, **Abb. 5.4C**), während es für Verbindung **5.10** vor den Liganden, in Richtung der Öffnung der aktiven Tasche, verschoben ist (in rot, **Abb. 5.4C**). Die 3-OH Gruppe am

C-Ring befindet sich in einer Distanz, um H-Brücken zu Ser141 ( $d = 2.4 \text{ \AA}$ ) der katalytischen Triade und zur Carbonylgruppe des *backbones* von Pro184 ( $d = 3.4 \text{ \AA}$ ) auszubilden. Eine direkte H-Brückenbindung der 3-OH Gruppe am C-Ring des Liganden mit Tyr154 kann nicht länger ausgebildet werden. Stattdessen interagiert die Carbonylgruppe des Inhibitors über ein Wassermolekül ( $d = 3.1 \text{ \AA}$ ) mit Tyr154. Der Methylchinolinkern ist vollständig in der hydrophoben Tasche vergraben, die von den Aminosäuren Pro95, Pro96, Leu191, Trp192 und Leu195 ausgebildet wird. Zusätzlich ist das Stickstoffatom des Chinolinkerns in H-Brückenreichweite zur Seitenkette von Gln148 ( $d = 3.1 \text{ \AA}$ , **Abb. 5.5D**).

## 5.7 Vergleich der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 und 17 $\beta$ -HSD10

Im Rahmen seiner Masterarbeit konnte MATTHÄUS DRABEK (AG KOLB, Philipps-Universität Marburg) durch einen Vergleich der Sequenzen von 17 $\beta$ -HSD Enzymen eine hohe Ähnlichkeit zwischen 17 $\beta$ -HSD14 und dem Subtypen 10 mit Hilfe einer MOE Sequenzüberlagerung feststellen.<sup>20</sup> Daher wurde ein Strukturvergleich zwischen den 3D-Strukturen des humanen 17 $\beta$ -HSD14 (PDB ID: 5L7Y) und humanen 17 $\beta$ -HSD10 (PDB: 1U7T) durchgeführt. Wie bereits beschrieben, kann die Struktur von 17 $\beta$ -HSD14 in zwei deutlich ausgeprägte Regionen unterteilt werden. In der ersten ist die ROSSMANN-Faltung lokalisiert, die an der Bindung des Cofaktors beteiligt ist, während in der zweiten Region die Substratbindetasche zu finden ist.<sup>18,19,21</sup> Der Strukturvergleich der beiden Subtypen 10 und 14 (**Abb. 5.6**) offenbart, dass der Cofaktor in einer nahezu identischen Geometrie in den entsprechenden Taschen angeordnet ist. Die zweite Region ist hingegen sehr speziell für die einzelnen Proteine, obwohl die katalytische Triade für beide an der gleichen Position in den entsprechenden Strukturen zu finden ist. Zum einen ist das *flexible loop* (Helices  $\alpha$ FG1 und  $\alpha$ FG2) von 17 $\beta$ -HSD10 im Vergleich zum Subtypen 14 etwas verkürzt, wohingegen für das erstgenannte Enzym eine auffallend lange Schleife im  $\alpha$ E- $\beta$ D verbindenden Segment ( $\alpha$ E $\rightarrow$  $\beta$ D) zu beobachten ist. Diese ist für die Bindung von 17-HSD10 zu  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) essentiell.<sup>23</sup> Wie in **Kapitel 3** beschrieben, induziert His93 zusammen mit Gln148 eine konische Form der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14. In der Bindetasche des Subtypen 10 kann kein analoges His beobachtet werden. Ferner wird die obere Seite der aktiven Tasche durch hydrophobe Reste begrenzt, sodass die Tasche in einer eher flachen Struktur vorliegt. Es scheint daher, dass 17 $\beta$ -HSD10 bevorzugt Liganden wie **AG18051** (**Abb. 5.6**)<sup>22</sup> aufnimmt, die an dieser Stelle eher plan in ihrem strukturellen Aufbau sind. Zusätzlich kann für dieses Enzym eine im Vergleich zu 17 $\beta$ -HSD14 weitere Öffnung der Substratbindetasche ausgemacht werden. In beiden Strukturen liegt das C-terminale Ende vollständig unstrukturiert vor, wobei dieses für 17 $\beta$ -HSD14 an der Interaktion zweier Monomere beteiligt ist.



**Abb. 5.6:** Überlagerung der Kristallstrukturen von *h*17 $\beta$ -HSD14 (gelb, PDB ID: 5L7Y) in ternärem Komplex mit Inhibitor **3.8**, und Cofaktor und *h*17 $\beta$ -HSD10 (orange, PDB ID: 1U7T) in Komplex mit Inhibitor **AG18051**.<sup>22</sup> Die Enzyme sind als Bändermodelle und die Liganden sind als Stäbchenmodelle dargestellt. Die Kohlenstoffatome sind in den Farben der entsprechenden Strukturen gehalten.

## 5.8 Untersuchung der Selektivität ausgewählter Verbindungen

Da die Pyridinketonklasse mit Verbindung **3.8** als Referenz aus einer Strukturbibliothek von 17 $\beta$ -HSD1 und -2 Inhibitoren stammte,<sup>19</sup> war es von großem Interesse zu überprüfen, ob nach den durchgeführten Strukturmodifikationen die hohe Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 beibehalten, und ob die gute Selektivität gegenüber dem Subtypen 2 sogar verbessert werden konnte. Wie zuvor beschrieben, zeigt 17 $\beta$ -HSD10 eine hohe Sequenzanalogie zum hier untersuchten Target. Dementsprechend wurde das Selektivitätsprofil der vierzehn potentesten 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren ( $K_i < 100$  nM) gegenüber den Subtypen 1, 2 als auch 10 untersucht. Die Inhibition der Subtypen 1 und 2 wurde von JANNINE LUDWIG (AK DUCHO, Universität des Saarlandes) und die des Subtypen 10 von Dr. GABRIELE MÖLLER (Helmholtz Zentrum München) mit Hilfe eines Radioaktivitätsassays untersucht, der bereits in **Kapitel 3** beschrieben wurde. Die Ergebnisse der Assays sind in **Tabelle 5.4** repräsentiert.

Die zuerst verfolgte Modifikation der Pyridinketonklasse resultierte in den weniger selektiven Verbindungen **5.1-5.4**, die eine erhöhte Affinität zu 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD2 (57-99% bzw. 82-100% Inhibition bei 1  $\mu$ M) verglichen mit der Startverbindung **3.8** (8 bzw. 56% Inhibition bei 1  $\mu$ M) erzielen. Das zu chinolinbasierenden Verbindungen führende zweite Modifikationskonzept lieferte die Inhibitoren **5.8** und **5.10-5.16** mit keiner signifikanten inhibitorischen Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1. Im Gegensatz dazu kann für das Naphthalen **5.9** eine hohe Potenz gegenüber diesem Enzym beobachtet werden (64% Inhibition bei 1  $\mu$ M).

In **Kapitel 3** wurde für Verbindung **3.8** ein kalkulierter  $K_i$  Wert ( $cK_i$ ) von 450 nM gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 bestimmt. Mit der Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 ( $K_i = 13$  nM) konnte ein guter Selektivitätsfaktor von 35 zwischen den 17-HSD Typen 2 und 14 beschrieben werden. Da für die Verbindungen **5.12**, **5.13** und **5.15** eine ähnliche 17 $\beta$ -HSD2 Inhibition (52-63% Inhibition bei 1  $\mu$ M) vermessen wurde, kann eine zu Verbindung **3.8** vergleichbare Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 angenommen werden.

Bei der Betrachtung von 17 $\beta$ -HSD10 kann lediglich für die Verbindungen **5.1** und **5.3** eine schwache Potenz gegenüber diesem Enzym beobachtet werden (17 und 19% Inhibition bei 1  $\mu$ M). Für alle anderen getesteten Verbindungen ist keinerlei inhibitorische Wirkung unter den gewählten Assaybedingungen zu erkennen, wonach diese als sehr selektiv gegenüber 17 $\beta$ -HSD10 zu bewertet sind.

**Tabelle 5.4:** Inhibitorische Aktivität der interessantesten Verbindungen gegenüber den 17 $\beta$ -HSD Subtypen 1, 2 und 10.

Verb.	17 $\beta$ -HSD1 (% Inh. @ 1 $\mu$ M) <sup>a</sup>	17 $\beta$ -HSD2 (% Inh. @ 1 $\mu$ M) <sup>b</sup>	17 $\beta$ -HSD10 (% Inh. @ 1 $\mu$ M) <sup>c</sup>
<b>3.8</b>	8	56	n.i.
<b>5.1</b>	69	100	17
<b>5.2</b>	57	82	n.i.
<b>5.3</b>	99	100	19
<b>5.4</b>	88	100	n.i.
<b>5.8</b>	6	76	n.i.
<b>5.9</b>	64	96	n.i.
<b>5.10</b>	12	78	n.i.
<b>5.11</b>	20	71	n.i.
<b>5.12</b>	n.i.	56	n.i.
<b>5.13</b>	n.i.	52	n.i.
<b>5.14</b>	21	83	n.i.
<b>5.15</b>	3	63	n.i.
<b>5.16</b>	11	80	n.i.

<sup>a</sup> 17 $\beta$ -HSD1 Enzym (Plazenta), zytosolische Fraktion, radioaktiver Verdrängungsassay, Substrat [<sup>3</sup>H]-E1 + E1 [500 nM], NADH [0.5 mM], Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, Standartabweichung < 10%. <sup>b</sup> 17 $\beta$ -HSD2 Enzym (Plazenta), mikrosomale Fraktion, radioaktiver Verdrängungsassay, Substrat [<sup>3</sup>H]-E2 + E2 [500 nM], NAD<sup>+</sup> [1.5 mM], Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, Standartabweichung < 10%. <sup>c</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat [<sup>3</sup>H]-E2 [25 nM], NAD<sup>+</sup> [0.75 mM], Mittelwert aus drei technischen Wiederholungen, Standartabweichung < 10%.



## 5.9 Bestimmung weiterer biologischer Eigenschaften

### 5.9.1 Zytotoxizität

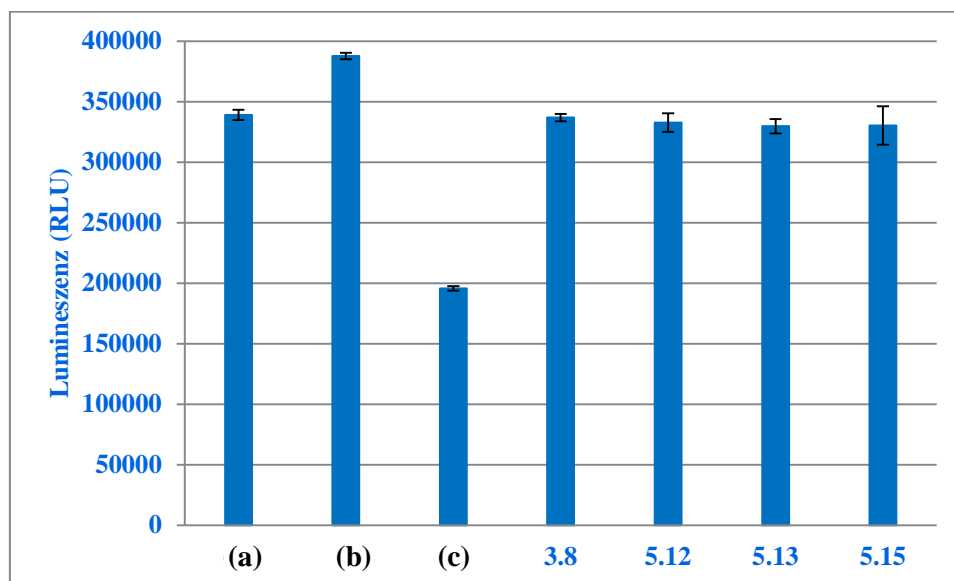
Sieben Verbindungen wurden auf Grundlage ihrer inhibitorischen Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 und ihres Selektivitätsprofils ausgewählt, um ihre potentielle Zytotoxizität in einem MTT Assay<sup>24</sup> auf HEK293 Zellen zu untersuchen. Die von NATHALIE GURAGOSSIAN (AG LE BORGNE, Université Claude Bernard Lyon) getesteten Inhibitoren **3.8**, **5.4**, **5.11**, **5.13** und **5.15** zeigen eine sehr geringe Zytotoxizität (IG<sub>50</sub> > 100  $\mu$ M). Aufgrund der niedrigen Löslichkeit der Verbindungen **5.10** und **5.12** konnten diese nicht bei einer Konzentration bis 100  $\mu$ M getestet werden. Dennoch besitzen diese eine Überlebensrate der Zellen von 80% bei einer Inhibitorkonzentration von 20  $\mu$ M, als höchste getestete Konzentration.

### 5.9.2 P-gp ATPase Aktivitätsassay

P-gp, ebenfalls als MDR1 und ABCB1 bekannt, ist ein Membranprotein das unter anderem an der luminalen Oberfläche der Blut-Hirn-Schranke zu finden ist.<sup>25</sup> Das Enzym ist eine ATP-abhängige Effluxpumpe, die eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der „multiple drug resistance“ (MDR) spielt.<sup>1</sup> HAESELEER *et al.* beschrieben, dass 17 $\beta$ -HSD14 neben anderen Kompartimenten vor allem im Gehirn exprimiert wird.<sup>26</sup> Da das Ziel dieses Projekts die Entwicklung eines Inhibitor *tool compounds* ist, welches *in vivo* appliziert werden kann, um die physiologische Rolle des Enzyms zu untersuchen, war es wichtig zu testen, ob die vielversprechendsten Inhibitoren einen Einfluss auf P-gp nehmen.<sup>16</sup> Hierbei wurden sowohl die mögliche Funktion der getesteten Verbindungen als Substrat und Inhibitor evaluiert, als auch eine generell ausbleibende Beeinflussung des Transporters. Verbindungen **3.8**, **5.12**, **5.13** und **5.15** aus beiden Klassen, der Pyridin- und der Chinolinklasse, wurden auf Interaktionen mit P-gp getestet, da diese die besten Aktivitäts- und Selektivitätsprofile aufweisen.

Der Assay wird sukzessiv durchgeführt, indem man den zu testende Inhibitor zunächst zusammen mit ATP und dem Protein in einer Zellmembranfraktion inkubiert. Die Reaktion wird unterbrochen und das nicht umgesetzte, im System verbliebene ATP, im folgenden Schritt quantifiziert. Hierzu ist nach Zugabe der ATP abhängigen Luciferase und dessen Substrat Luciferin das gebildete Lumineszenzsignal zu detektieren. Der Einfluss der getesteten Inhibitoren **3.8**, **5.12**, **5.13** und **5.15** auf die Effluxpumpe wird untersucht, indem die erhaltenen Ergebnisse mit denen von unbehandelten Proben (**a**), mit P-gp Inhibitor Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (**b**) behandelten Proben und mit P-gp-Substrat Verapamil (**c**) behandelten Proben verglichen werden (**Abb. 5.7**). Durch die Zugabe des Inhibitors wird der Verbrauch an ATP durch P-gp blockiert, was im Vergleich zur Kontrolle zu einem stärkeren Lumineszenzsignal führt. Der Unterschied beider Signale spiegelt die Grundaktivität des getesteten Proteins wieder. Verapamil als Substrat stimuliert die ATPase Aktivität, was in einem geringeren

Lumineszenzsignal im Vergleich zur Kontrolle resultiert. Für die Verbindungen **3.8**, **5.12**, **5.13** und **5.15** kann kein signifikanter Unterschied zum Lumineszenzsignal der Kontrolle identifiziert werden (**Abb. 5.7**), wodurch sich diese weder als Substrate noch als Inhibitoren von P-gp auszeichnen.



**Abb. 5.7:** Effekt der vier 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren **3.8**, **5.12**, **5.13** und **5.15** auf die P-gp ATPase Aktivität. Die Daten sind in *relative light units* (RLU) beschrieben.



## 5.10 Diskussion der Ergebnisse

### 5.10.1 Struktur-Wirkungsbeziehung der im ersten Ansatz entworfenen pyridinbasierenden Inhibitoren

Die erste strukturbasierte Modifikation führte im Vergleich zur Startverbindung **3.8** ( $K_i = 13$  nM) zur zehnfach potenteren Verbindung **5.4** ( $K_i = 1.5$  nM). Die Kristallstruktur von **5.4** im Komplex mit dem Protein deckt auf, dass die Ethenylgruppe im Gegensatz zu der Carbonylfunktion hydrophobe Interaktionen mit den Aminosäuren Leu191, Leu195 und Trp192 ausbilden kann. Dabei verbleibt der Interplanarwinkel zwischen den beiden aromatischen Gruppierungen im gleichen Bereich. Zusätzlich sollte dieses Verbindungsglied zwischen dem B- und dem C-Ring einen geringeren Preis für die Desolvatation im Vergleich zu Verbindung **3.8** benötigen. Die Rotation des A-Rings im Vergleich zur Startverbindung führt zu einer verbesserten Geometrie in der der A-Ring in einem engeren Kontakt zur Region, die durch die Aminosäuren Pro95, Pro96 und Leu195 ausgebildet wird, steht. Ferner wird durch diese Konformation eine günstigere Distanz ( $d = 2.7$  Å) zwischen der 3-OH Gruppe am A-Ring und der *backbone* Carbonylgruppe von Ala149 ermöglicht. Diese Punkte könnten in Summe zu dem zu beobachtenden Gewinn an Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 führen.

Für den Ether **5.1** und die Amine **5.2** und **5.3** kann keine Steigerung der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zur Startverbindung **3.8** festgestellt werden, wohingegen für die Verbindungen **5.5-5.7** ein zum Teil drastischer Potenzverlust (Faktor 25-150) zu beobachtet ist. Dies ist wahrscheinlich auf die polaren Amidgruppen dieser Liganden zurückzuführen, die in die vorrangig hydrophobe aktive Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 lokalisiert werden. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass die A-Ringe dieser Verbindungen auf Grund ihrer Länge aus der Bindetasche herausragen und so dem Solvens ausgesetzt verbleiben.

### 5.10.2 Selektivität der pyridinbasierenden Inhibitoren

Alle in diesem Kapitel neu beschriebenen pyridinbasierenden Inhibitoren zeigen eine hohe Selektivitätsdiskriminierung gegenüber dem 17 $\beta$ -HSD10 Isoenzym. Mögliche Gründe für die reduzierte Bindung gegenüber diesem Enzym der hier vorgestellten Inhibitoren könnte in der unterschiedlichen Form der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD10 im Vergleich zum Subtypen 14 begründet sein. Für den letzteren Fall wurde eine konische Form beschrieben an die die hier entworfenen Verbindungen durch ihre V-Form optimal angepasst wurden (**Kapitel 3**). Für 17 $\beta$ -HSD10 ist eine Kristallstruktur im Komplex mit einem Inhibitor (**AG18051**) beschrieben worden (PDB ID: 1U7T, **Abb. 5.6**).<sup>22</sup> Dieser Hybridinhibitor besteht aus einem in die aktive Tasche ragenden Teil, der kovalent mit dem Cofaktor verknüpft vorliegt. Aus der Kristallstruktur von HSD10 ist zu erkennen, dass durch das Fehlen eines analogen His in der aktiven Tasche eine weniger konische Form resultiert. In diese

scheinen daher Inhibitoren mit einem eher planen Aufbau besser binden zu können, wie für den entsprechenden Teil des Inhibitors **AG18051** zu beobachten ist. Ebenfalls ist zu erkennen, dass eine Phenylgruppe seitlich aus der aktiven Tasche ragt, da diese im Vergleich zu 17 $\beta$ -HSD14 eine größere Öffnung hat. An dieser Stelle befinden sich im Subtypen 14 Leu192 und Pro96, die hydrophobe Kontakte mit dem B-Ring der Liganden ausbilden können. Diese Wechselwirkungen bleiben somit für eine mögliche Bindung in 17 $\beta$ -HSD10 aus, was gegebenenfalls zu einer Reduktion der Wirkstärke der Inhibitoren führt.

Für die Subtypen 1 und 2 sind hohe Aktivitäten für die vorgestellten Inhibitoren festzustellen, die augenscheinlich durch die unterschiedlichen Brückenglieder zwischen dem B- und dem C-Ring der Verbindungen **5.1-5.4** hervorgerufen werden. Besonders für den Subtypen 1 ist verwunderlich, dass die Substitution einer Carbonylfunktion durch die alternative Brücke zu einem solch dramatischen Effekt bezüglich der Selektivität führt. Eine Erklärung für diese Beobachtung anhand eines Vergleichs der Kristallstrukturen zu finden, gestaltet sich als schwierig. Zum einen weist 17 $\beta$ -HSD1 eine im Vergleich zu den Subtypen 10 und 14 eine besondere Substratbindetasche auf, wie es in **Kapitel 3** beschrieben wurde (Vergleich der Strukturen von 17 $\beta$ -HSD1 und 17 $\beta$ -HSD14). Ebenso konnte trotz der jahrzehntelangen Forschung für dieses Enzym keine Kristallstruktur im Komplex mit einem nichtsteroidalen Inhibitor erhalten werden, die Anlass für einen Vergleich der Bindungsmodi geben könnte. Um diese Effekte besser verstehen zu können, sollte in naher Zukunft der Erhalt von Kristallstrukturen dieser Inhibitoren im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD1 angestrebt werden. Für den membrangebundenen Subtypen 2 konnte bisher sogar gar keine Struktur erhalten werden. Zumindest ein Homologiemodell dieses Enzyms könnte hier den Strukturvergleich plausibel machen.

Insgesamt ist es nach der Betrachtung der Selektivitätsprofile der Inhibitoren **5.1-5.4** sinnvoll, das Carbonylmotiv als Verbindungsglied zwischen dem B- und dem C-Ring während der weiteren Modifikationen von Verbindung **3.8** beizubehalten.

### 5.10.3 Struktur-Wirkungsbeziehung der im zweiten Ansatz entworfenen Verbindungen

Während des zweiten Ansatzes war es das Ziel, den Pyridinkern der Ausgangsverbindung **3.8** zu erweitern um die in **Abb. 5.2** beschriebene freie Bindungstasche auszufüllen. Von dem zunächst entworfenen Chinolinderivat **5.8** wurde eine modelliert Struktur im Komplex mit dem Protein angefertigt, um die prinzipielle Passform des vorgeschlagenen Inhibitors **5.8** in die aktive Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 nahezulegen (**Abb. 5.8, Appendix**). Diese konnte später nach der Synthese des Derivats durch eine Co-Kristallstruktur verifiziert werden. Inhibitor **5.8** zeigt eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 ( $K_i = 12$  nM), die mit der von Verbindung **3.8** vergleichbar ist. Analog zu der in **Kapitel 3** beschriebenen Studie ist der Austausch der 3-OH Gruppe am C-Ring durch ein 3-OMe Motiv unzureichend für die Bindungsaffinität (21% Inhibition bei 100  $\mu$ M). Verbindung **5.9** wurde

dargestellt, um auch in dieser Klasse die Rolle des Stickstoffatoms (hier im Chinolinkern) von Verbindung **5.8** zu untersuchen. Dieses Analogon zeigt im Vergleich zu **5.8** eine ähnliche Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 ( $K_i = 6$  nM). Allerdings erhöht das Stickstoffatom am Chinolinkern die Löslichkeit des Inhibitors **5.8** im Vergleich zu seinem Naphthalenanalogen (**Tabelle 5.5, Appendix**). Zusätzlich kann im direkten Vergleich beider Verbindungen ein schlechteres Selektivitätsprofil von Verbindung **5.9** zu den 17 $\beta$ -HSD Subtypen 1 und 2 festgestellt werden.

Die Ausstattung des Chinolinkerns von Verbindung **5.8** in den Positionen 6 und 7 mit Substituenten mit einem unterschiedlichen Hydrophobizitätsprofil resultierte in den hochpotenten Inhibitoren **5.10-5.16**. Ausgehend von den Kristallstrukturen der Verbindungen **5.12** und **5.15** im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14 kann beobachtet werden, dass diese einen zum Inhibitor **5.8** vergleichbaren Bindungsmodus in die aktive Tasche des Targets aufweisen, indem sie vor allem Interaktionen mit Tyr154 und Ser141 der katalytischen Triade ausbilden. Die zusätzlichen hydrophoben Kontakte, die durch das erweiterte Kernmotiv mit der Tasche um die Aminosäuren Leu191, Trp192, Leu195 und Met199 ermöglicht werden, könnten den Verlust des A-Rings und den Verlust der Interaktion mit Ala149 kompensieren, die für Verbindung **3.8** beschrieben wurde (**Kapitel 3**). So können beispielsweise für die Inhibitoren **5.8** und **3.8** identische Affinitäten zu 17 $\beta$ -HSD14 beschrieben werden (**5.8**:  $K_i = 12$  nM vs. **3.8**:  $K_i = 13$  nM). Die Nitrilgruppe von Verbindung **5.12** ragt aus der aktiven Tasche heraus ohne zusätzliche Interaktionen mit dem Protein auszubilden, was in keiner signifikanten Änderung der Bindungsaffinität im Vergleich zu den gerade beschriebenen Inhibitoren resultiert ( $K_i = 9$  nM). Für Verbindung **5.15** ist eine zusätzliche H-Brückenbindung über das primäre Amin mit der Seitenkette von Gln150 zu beobachten. Im Vergleich zu Verbindung **5.8** kann für den Inhibitor **5.15** jedoch kein Gewinn an Affinität festgestellt werden ( $K_i = 23$  nM). Da sich Gln150 am Eingang der aktiven Tasche befindet und zum Solvens exponiert verbleibt, ist davon auszugehen, dass die zusätzlich ausgebildete H-Brücke keinen Bindungsbeitrag mit sich bringt. Eine ähnliche Beobachtung bezüglich der inhibitorischen Aktivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 kann für Inhibitor **5.13** gemacht werden, der eine relativ hydrophile Tetrazolgruppe trägt ( $K_i = 10$  nM). Da von dieser Verbindung keine Kristallstruktur im Komplex mit dem Protein erhalten werden konnte, wurde eine modellierte Struktur des Liganden in der aktiven Tasche angefertigt (**Abb. 5.9C, Appendix**). Diese Geometrie wurde auf der Grundlage des Bindungsmodus der bereits beschriebenen Inhibitoren vorgeschlagen. Dabei konnte ebenfalls eine mögliche Interaktion des 2H-Tetrazols mit der Seitenkette von Gln150 beobachtet werden. Das Ausbleiben eines signifikanten Unterschieds in den Bindungsaffinitäten kann analog zu Verbindung **5.15** erklärt werden. Aus der modellierten Struktur von Verbindung **5.14** ist keine zusätzliche Interaktion der eingeführten Aminogruppe mit dem Protein zu erkennen (**Abb. 5.9B, Appendix**). Sie ist in Richtung der Öffnung der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 orientiert, sodass weiterhin keine repulsiven Interaktionen beobachtet werden können und sodass kein signifikanter Affinitätsunterschied zu Verbindung **5.8** resultiert (**5.14**:  $K_i = 34$  nM). Die

Einführung einer 6-OH Gruppe am Chinolinkern führt zu einem Verlust an Bindungsaffinität für Verbindung **5.11** ( $K_i = 119$  nM) im Vergleich zum unsubstituierten Inhibitor **5.8**. Auch für diese Verbindung wurde eine modellierte Struktur angefertigt aus der hervorgeht, dass die angesprochene Hydroxyfunktion in eine hydrophobe Region ragt, die durch Met199 und Thr205 ausgebildet wird (**Abb. 5.9B**, **Appendix**) und dadurch negativ zur inhibitorische Wirkung gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 beiträgt.

#### 5.10.4 Entdeckung eines alternativen Bindungsmodus für Verbindung **5.10**

Der unterschiedliche Bindungsmodus des Inhibitors **5.10** resultiert im Vergleich zu Verbindung **5.8** in keinem signifikanten Unterschied der Bindungsaffinität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 (**5.10**:  $K_i = 6$  nM). Interessanterweise kann für diesen Liganden keine direkte Interaktion zwischen der 3-OH Gruppe am C-Ring und Tyr154 der katalytischen Triade beobachtet werden, die zuvor als essentiell für eine hohe Potenz gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 beschrieben wurde. Allerdings ist es der angesprochenen Hydroxygruppe noch immer möglich eine H-Brücke zu Ser141 auszubilden. Tyr154 hingegen verbleibt in einem H-Brückennetzwerk involviert in dem es über ein Wassermolekül mit der Carbonylfunktion des Liganden interagiert. Zusätzlich kann mit dem neuen Bindungsmodus für diesen Inhibitor zum ersten Mal eine zusätzliche H-Brücke zur Seitenkette von Gln148 beobachtet werden. Der Chinolinkern mit seinem Methylsubstituenten befindet sich tief eingebettet in einer hydrophoben Tasche von Leu191, Trp192, Leu195, Met199 und Thr205, wodurch ein starker hydrophober Kontakt mit dem Protein gewährleistet wird. Zusammen gesehen scheinen diese neuen Interaktionen den Verlust der direkten Interaktion zu Tyr154 kompensieren zu können und heben dessen Bedeutung zusätzlich hervor. Aus dem Vergleich mit dem Hydroxyanalogon **5.11** kann geschlossen werden, dass der Ligand **5.10** durchaus mit dem üblichen Bindungsmodus in die Bindetasche von 17 $\beta$ -HSD14 passt und Interaktionen mit der für Verbindung **5.11** angesprochenen hydrophoben Region eingehen könnte. Allerdings passen sie sich im Sinne eines „*induced fit*“ optimal der aktiven Tasche an, indem sie die Seitenkette von Tyr253` des benachbarten Monomers verschieben. Ähnliche Beobachtungen konnten kürzlich von CASSETTA *et al.* bei der Strukturanalyse des aus einem Fadenpilz stammenden Subtypen 17 $\beta$ -HSDcl im Komplex mit verschiedenen Liganden gemacht werden.<sup>27</sup> Dort sorgte der Austausch einer Hydroxy- gegen eine Methoxygruppe am Liganden für einen alternativen Bindungsmodus, bei dem ebenfalls eine Reihe von Aminosäure in der Inhibitorbindetasche verdrängt wurden.

Das Wassermolekül, das an der Stabilisierung der Verbindung **5.10** involviert ist, kann ebenfalls in der Holostruktur (PDB: 5JSF) beobachtet werden. In der 3D-Struktur der weiteren Inhibitoren ist dieses allerdings durch die Liganden verdrängt. Eine mögliche Rolle im katalytischen Mechanismus konnte diesem Wassermolekül bisher nicht zugesprochen werden. Dennoch sollte es beim Entwurf weiterer Inhibitoren berücksichtigt werden, da es einen vielversprechenden Interaktionspartner darstellt.

### 5.10.5 Selektivität der chinolinbasierenden Inhibitoren

Nach der Betrachtung der Selektivitäten der dargestellten chinolinbasierenden Inhibitoren ist für alle Vertreter die Klasse eine sehr geringe Affinität zu den 17 $\beta$ -HSDs 1 und 10 zu beobachten. Die zusätzliche Betrachtung von 17 $\beta$ -HSD2 hebt die Verbindungen [5.12](#), [5.13](#) und [5.15](#) hervor, die insgesamt ein zu Verbindung [3.8](#) vergleichbares Selektivitätsprofil zeigen.

### 5.10.6 Identifizierung möglicher *tool compounds*

Wie zu Beginn dieses Kapitels beschrieben, sollten die am besten geeigneten Inhibitoren im weiteren Verlauf dieses Projekts als mögliche *tool compounds* zur Aufklärung der physiologischen Rolle von 17 $\beta$ -HSD14 nach deren *in vivo* Applikation dienen. Hierzu kann eine sukzessive Filterung verfolgt werden, bei der in verschiedenen Teststufen die Inhibitoren mit unzureichenden Eigenschaften ausgefiltert werden.

Vor ihrer Synthese wurden die *in silico* bestimmten physikochemische Eigenschaften der Inhibitoren herangezogen, um die Bioverfügbarkeit der Verbindungen bewerten zu können. Für alle Verbindungen wurden gute Eigenschaften nach den Regeln von VEBER<sup>13</sup> und LIPINSKI'S „rules of five“<sup>14</sup> determiniert.

Im nächsten Schritt wurden die Aktivitätsdaten gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 ermittelt und die aktivsten Vertreter wurden bezüglich ihrer Selektivität gegenüber drei wichtiger 17-HSD Enzymen untersucht. Dabei kristallisierten sich die Verbindungen [3.8](#), [5.12](#), [5.13](#) und [5.15](#) mit den besten Profilen heraus. Diese wurden herangezogen, um deren zytotoxische Aktivität zu untersuchen.

Die Inhibitoren [3.8](#), [5.13](#) und [5.15](#) zeigen eine sehr geringe Zytotoxizität (IG<sub>50</sub> > 100  $\mu$ M), während Verbindung [3.12](#) auf Grund einer geringeren Löslichkeit lediglich bis zu einer Inhibitorkonzentration von 20  $\mu$ M getestet wurde, bei der eine gute Zellüberlebensrate von 80% festgestellt werden kann. Die geringere Löslichkeit dieser Verbindung soll jedoch nicht als Ausschlusskriterium dienen, da Verbindung [3.12](#) beispielsweise in Form des entsprechenden Hydrochlorids eine deutlich höhere Löslichkeit in wässrigen Medien aufweisen sollte.

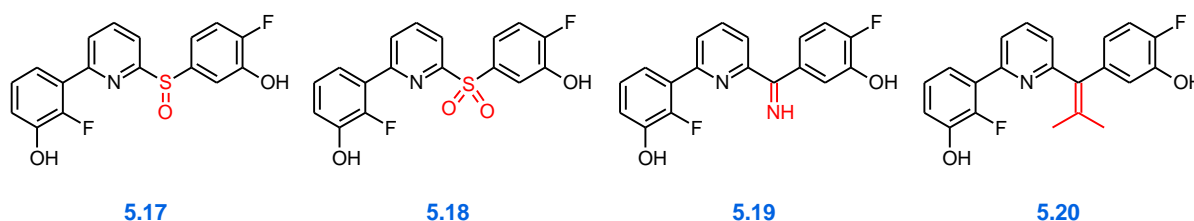
Im nächsten Schritt wurden die Verbindungen [3.8](#), [5.12](#), [5.13](#) und [5.15](#) gewählt, um deren Einfluss auf das *multi-drug resistance protein* P-gp (MDR1) zu untersuchen. Alle getesteten Inhibitoren sind weder als Substrate noch als Inhibitoren dieser Effluxpumpe zu identifizieren, was als ein positiver Aspekt bezüglich der Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen zu bewerten ist.

Weiterhin wurde die Fähigkeit der entworfenen Verbindung die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden untersucht, da für 17 $\beta$ -HSD14 beschrieben wurde, dass es unter anderem im Gehirn exprimiert wird.<sup>15</sup> Nach den von PAJOUHESH und LENZ<sup>16</sup> beschriebenen Eigenschaften sind die Verbindungen [5.13](#) und

**5.15** als ungeeignet zu betrachten, da sie durch das Tetrazol- (**5.13**) bzw. das Glycinmotiv (**5.15**) eine zu hohe Polarität aufweisen. Besonders aber ist die hohe Azidität des Tetrazolrings als Bioisoster einer Carbonsäure zu nennen, die für ein mögliches Überwinden der Blut-Hirn-Schranke abträglich sein sollte.<sup>16</sup> Dennoch können beide Verbindungen im Hinblick auf eine mögliche Verabreichung in andere Kompartimente, in denen das 17 $\beta$ -HSD14 vorkommt, untersucht werden. Hingegen können die Inhibitoren **3.8** und **5.12** hervorgehoben werden, für die vor allem im Gegensatz zu den Verbindungen **5.13** und **5.15** eine gute bis sehr gute tPSA, eine akzeptable Anzahl an H-Brücken Akzeptoren und Donoren, sowie ein guter pKa Wert berechnet werden konnten. Für das Pyridinderivat **3.8** und die Chinolinverbindung **5.1** kann daher eine gute Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke angenommen werden. Durch die hier beschriebenen Methoden konnten demnach zwei Kandidaten ermittelt werden, die auf eine mögliche Applikation in das zentrale Nervensystem hin weiter untersucht werden sollten.

## 5.11 Fazit

In dem vorgestellten Kapitel wurde gezeigt, dass der Austausch der Carbonylgruppe im Vergleich zur Startverbindung **3.8** äquipotente Verbindungen liefert. Inhibitor **5.4** mit einem Ethenylmotiv als Verbindungsglied zwischen dem B- und dem C-Ring zeigt eine um den Faktor zehn höhere Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14. Jedoch kann für alle Verbindungen dieses Optimierungsansatzes ein im Vergleich zur Ausgangsverbindung schlechteres Selektivitätsprofil zu den 17 $\beta$ -HSD-Subtypen 1 und 2 nachgewiesen werden. Eine Carbonylgruppe als Bindeglied ist somit nach dem derzeitigen Stand der Ergebnisse die beste Wahl. An dieser Stelle könnten Dockingstudien an 17 $\beta$ -HSD1 eine mögliche Erklärung für die höhere Affinität zu diesem Enzym liefern und mit anderen Studien anhand von 17 $\beta$ -HSD10 Aufschluss für die gute Selektivität gegenüber diesem 17 $\beta$ -HSD geben. Auch auf Grundlage dieser Erkenntnisse könnten im weiteren Verlauf des Projekts zusätzliche Motive als Verbindungsglieder zwischen dem B- und dem C-Ring untersucht werden, um die Selektivität, die pharmakokinetischen Eigenschaften und um die metabolische Stabilität der Leitstruktur zu erhöhen, falls sich letztere als unzureichend für die hier beschriebenen Inhibitoren herausstellt. So könnten sich Bioisostere des Carbonyls wie eine Sulfoxid-, Sulfonyl- und eine Iminfunktion anbieten (**5.17-5.19**, **Abb. 5.8**). Diese sind zwar wie auch die Carbonylgruppe polar, das bei 17 $\beta$ -HSD14 in einer hydrophoben Tasche lokalisiert ist, allerdings könnten diese Verbindungsglieder wie auch die Carbonylfunktion von Verbindung **3.8** toleriert werden und eine ähnliche Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 als auch eine ähnliche Selektivität, besonders zum Subtypen 1, hervorrufen. Für die ersten beiden Brückenglieder muss jedoch geprüft werden, ob die Geometrien der Inhibitoren denen der Ausgangsverbindung **3.8** entsprechen. Sterisch kleinere polare Gruppen, wie der Ether (**5.1**) und das sekundäre Amin (**5.2**), aber vor allem die hydrophobe Ethenylfunktion scheinen in die aktive Tasche von 17 $\beta$ -HSD1 zu passen, die möglicherweise an dieser Bindungsstelle ebenfalls hydrophob ist. Sterisch anspruchsvollere Gruppen wie eine Methylpropenylgruppe (**5.20**) könnten somit ebenfalls getestet werden, um Selektivität gegenüber dem Subtypen 1 zu erreichen.



**Abb. 5.8:** Weitere Verbindungen mit unterschiedlichen Verbindungsgliedern zwischen dem B- und dem C-Ring.

Aus der Entwicklung der chinolinbasierenden Inhibitoren gingen hochpotente 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren hervor, wobei drei Verbindungen identifiziert werden konnten, die neben der pyridinbasierenden Ausgangsverbindung **3.8** ebenfalls ein gutes Selektivitätsprofil gegenüber den 17 $\beta$ -HSD Subtypen 1, 2



und 10 aufweisen. Zwei dieser Verbindungen, **3.8** und **5.12**, stellten sich während des zweiten *profilings* als mögliche Kandidaten für eine *in vivo* Applikation im zentralen Nervensystem heraus. Der geringeren Löslichkeit der Nitrilverbindung **5.12** könnte, wie beschrieben, durch die Überführung in das entsprechende Hydrochlorid abgeholfen werden. Neben einer sehr geringen Zytotoxizität, und keiner beobachteten Beeinflussung der Effluxpumpe P-gp konnten für diese Inhibitoren erste physikochemischen Eigenschaften berechnet werden, die eine mögliche Penetration der Blut-Hirn-Schranke vorhersagen.

In den folgenden Schritten sollte nun für diese Verbindungen unter anderem weitere Untersuchungen bezüglich der AMDE-Parameter angestrebt werden. Die Bestimmung der Zellpermeabilität könnte mit Hilfe eines PAMPA-Assays ermittelt werden, oder mit einem MDCK-*hMDR1*-Assay, der durch die hohe Expression an P-gp als geeignetes Modellsystem für die Blut-Hirn-Schranke gilt.<sup>28</sup> Weiterhin muss die metabolische Stabilität der Inhibitoren untersucht und mögliche Metabolite identifiziert werden.

Mit dem alternativen Bindungsmodus für Verbindung **5.10** konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. Durch die Einführung einer Methylgruppe in den Chinolinkern scheint die Verbindung tiefer in aktive Tasche „gedrückt“ zu werden. Für die Identifizierung von alternativen Leitstrukturen zur Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren könnten ebenfalls Dockingstudien am Enzym durchgeführt werden. Die hier beschriebenen neuen Erkenntnisse bezüglich des alternativen Bindungsmodus sollten dabei unbedingt berücksichtigt werden.



## 5.12 Experimental Section

### 5.12.1 Chemistry

#### Chemical methods

Chemical names follow IUPAC nomenclature.

Starting materials were used as purchased from Acros Organics, Alfa Aesar, Combi-Blocks and Sigma Aldrich without further purification.

Reaction progress was monitored by TLC on aluminium sheets (Silicagel 60 F254, Merck) and visualization was accomplished with UV light.

All microwave irradiation experiments were carried out in a CEM-Discover apparatus.

Column chromatography was performed on silica gel (40-63  $\mu$ m, Macherey-Nagel).

Purification with preparative HPLC was carried out on a Varian PrepStar 218 gradient system using a ProStar 320 detector. A ProntoSIL C18 column (5.0  $\mu$ m, 120 Å, 250-32 mm) was used with an acetonitrile/water gradient containing 0.1% TFA at a flow rate of 20 ml/min. All solvents were HPLC grade. Detection was performed at a wavelength of 254 nm.

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker AV II-300 spectrometer (at 300 MHz), a JEOL ECX-400 spectrometer (at 400 MHz and 100 MHz, respectively) and on a JEOL ECA-500 spectrometer (at 500 MHz and 125 MHz, respectively). Chemical shifts are reported in  $\delta$  values (parts per million: ppm), using the hydrogenated residues of deuterated solvents as internal standard<sup>29</sup>: 2.05 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 29.8 ppm and 206.3 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR), acetone- $d_6$ ; 7.26 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 77.2 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR),  $\text{CDCl}_3$ ; 2.50 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 39.5 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR), DMSO- $d_6$ . Signals are described as s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), dt (doublet of triplet) and m (multiplet), respectively. All coupling constants ( $J$ ) are given in Hertz (Hz).

Infrared spectroscopy was performed on a Bruker ALPHA FT-IR spectrometer as neat sample.

Elemental analysis was carried out on a vario MICRO elemental analyzer.

Mass spectrometry was performed on a Q-Trap 2000 (Applied Biosystems) equipped with an electrospray interface (ESI).

The purity of the tested compounds was evaluated by HPLC. The Shimadzu<sup>®</sup>-system consisted of a LC-20AT pump, an SIL-20A autosampler and a SPD-M20A PDA detector. The system was operated by the standard software LCsolution<sup>®</sup>. A RP C18 NUCLEODUR<sup>®</sup> (125 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m) column (Macherey-Nagel) was used. All solvents were HPLC grade. In a gradient run the percentage of acetonitrile (containing 0.1% trifluoroacetic acid) in water (containing 0.1% trifluoroacetic acid) was increased from initial concentration of 30% at 0 min to 90% at 15 min and kept at 90% for 5 min (HPLC-method A) or from initial concentration of 10% at 0 min to 90% at 20 min and kept at 90% for

5 min (HPLC-method B). The injection volume was 25  $\mu$ l at a flow rate of 1.00 ml/min. UV spectra were recorded at a wavelength of 254 nm. All tested compounds have  $\geq$  95% chemical purity.

## **General procedures**

### **General procedure for SUZUKI-MIYaura coupling**

#### **Method 5.A**

A mixture of arylbromide (1.0 eq), boronic acid (1.2 eq), cesium carbonate (4.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.02 eq) was solved in DME/water (2:1), degassed and charged with argon. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The reaction mixture was cooled down to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### **General procedures for ether cleavage**

#### **Method 5.B1**

A solution of methoxy derivative (1.0 eq) in dry dichloromethane was cooled to -80 °C and boron tribromide (1.0 M in dichloromethane, 5.0 eq per methoxy function) was slowly added under argon. The reaction mixture was stirred at -80 °C for 1 h and then allowed to warm to room temperature overnight. The mixture was cooled in an ice bath, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

#### **Method 5.B2**

To a solution of methoxy derivative (1.0 eq) in anhydrous dichloromethane, boron trifluoride dimethylsulfide complex (35 eq per methoxy function) was added dropwise under argon and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with water and extracted with dichloromethane or ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography or preparative HPLC.

**General procedure for *N*-methylation****Method 5.C**

A solution of amide derivative (1.0 eq) in dimethylformamide was cooled down to 0 °C and sodium hydride (60% w/w, 1.5 eq) was added. The mixture was warmed to room temperature for 20 min and cooled down again to 0 °C. Iodomethane (2.0 eq) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature. The end of the reaction was monitored by TLC. Water was added to quench the reaction and the aqueous layers were extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography.

**General procedure for amide formation****Method 5.D**

A solution of carboxylic acid derivative (1.0 eq, 0.2 M), thionyl chloride (2.0 eq) and dimethylformamide (catalytic amount) in toluene was stirred at 110 °C for 4 h under argon atmosphere. The mixture was cooled down to room temperature and the solvent as well as the excess of thionyl chloride were removed under reduced pressure. The residue (0.2 M) was solved in dry dichloromethane and the appropriate amine (1.0 eq) as well as trimethylamine (1.0 eq) were added at 0 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was taken up in ethyl acetate. The organic layers were washed with 0.5 M hydrochloric acid, saturated sodium bicarbonate and brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography.

**General procedures for alcohol formation****Method 5.E1**

A solution of *n*-BuLi (1.0 eq, 2.5 M in hexane) was diluted with anhydrous tetrahydrofuran to a concentration of 0.8 M and arylbromide (1.0 eq) in anhydrous tetrahydrofuran was slowly added at -80 °C under argon. The resulting solution was stirred for 15 min at -80 °C. A solution of the appropriate aldehyde (1.0-1.1 eq) in anhydrous tetrahydrofuran was added and the reaction solution was stirred for additional 15 min at -80 °C and at room temperature for 2 h. The mixture was quenched with saturated ammonium chloride and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

### Method 5.E2

A mixture of arylbromide (1.0 eq), magnesium turnings (1.1 eq) and a catalytic amount of iodine in anhydrous tetrahydrofuran was stirred for 2 h at 60 °C under argon. A solution of the appropriate aldehyde in anhydrous tetrahydrofuran was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C. The end of the reaction was monitored by TLC. The mixture was quenched with brine and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

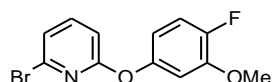
### General procedure for alcohol oxidation

#### Method 5.F

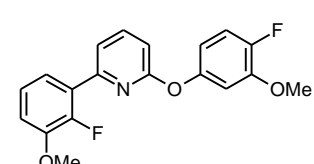
2-Iodoxybenzoic acid (1.2 eq) was added to a solution of alcohol derivative (1.0 eq) in tetrahydrofuran and the reaction mixture was stirred at 60 °C. After the end of the reaction (monitored by TLC) the mixture was cooled to room temperature, quenched with saturated sodium thiosulfate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water and saturated sodium bicarbonate, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

## Detailed synthesis procedures and compounds characterization

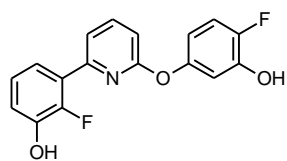
**2-Bromo-6-(4-fluoro-3-methoxyphenoxy)pyridine (5.1b).**

 A mixture of sodium hydride (60% w/w) (88 mg, 2.2 mmol, 1.1 eq) in anhydrous dimethylformamide (5.0 ml) was cooled down to 0 °C and 4-fluoro-3-methoxyphenol (**5.1c**) (184 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) was slowly added under argon. After 5 min a solution of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (474 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) in anhydrous dimethylformamide (5.0 ml) was slowly added at room temperature and the reaction mixture was stirred overnight at 100 °C. The mixture was quenched with saturated sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 19:1) to give 154 mg (0.52 mmol, 26%) of the analytically pure compound. C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>BrFNO<sub>2</sub>; MW 298; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.52 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.20 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.07 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.8 Hz, 1H), 6.79 (dd,  $J$  = 7.4 Hz, 2.6 Hz, 1H), 6.77 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 6.66 (ddd,  $J$  = 8.8 Hz, 3.6 Hz, 2.8 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  163.0 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 149.8 (d,  $J$  = 241.3 Hz), 149.7 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 148.4 (d,  $J$  = 12.1 Hz), 141.4, 139.3, 122.6, 116.3 (d,  $J$  = 20.0 Hz), 112.8 (d,  $J$  = 7.0 Hz), 109.5, 107.2 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 56.4; MS (ESI): 298, 300 (M+H)<sup>+</sup>.

**2-(4-Fluoro-3-methoxyphenoxy)-6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine (5.1a).**

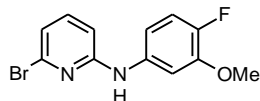
 According to **method 5.A** the title compound was prepared by reaction of 2-bromo-6-(4-fluoro-3-methoxyphenoxy)pyridine (**5.1b**) (150 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (102 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1) to give 151 mg (0.44 mmol, 88%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>; MW 343; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.76 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J$  = 7.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.41 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.7 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.12-7.05 (m, 2H), 6.97 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.88 (dd,  $J$  = 7.3 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 6.73 (ddd,  $J$  = 8.8 Hz, 3.6 Hz, 2.8 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.86 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  163.1 (d,  $J$  = 1.1 Hz), 151.2 (d,  $J$  = 2.4 Hz), 150.9 (d,  $J$  = 250.8 Hz), 150.2 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 149.5 (d,  $J$  = 242.6 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 7.2 Hz), 148.2 (d,  $J$  = 8.4 Hz), 140.2, 127.3 (d,  $J$  = 8.7 Hz), 124.0 (d,  $J$  = 4.9 Hz), 122.0 (d,  $J$  = 2.2 Hz), 119.5 (d,  $J$  = 11.4 Hz), 116.1 (d,  $J$  = 19.9 Hz), 113.7 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 113.0 (d,  $J$  = 6.9 Hz), 110.0, 107.4 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 56.6, 56.4; MS (ESI): 344 (M+H)<sup>+</sup>.

### 2-Fluoro-3-[6-(4-fluoro-3-hydroxyphenoxy)pyridin-2-yl]phenol (**5.1**).

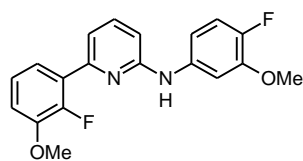


According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of 2-(4-fluoro-3-methoxyphenoxy)-6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine (**5.1a**) (133 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.9 ml, 3.9 mmol, 10.0 eq) in dichloromethane (8.0 ml). The crude product was purified by preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 75:25:0.1  $\rightarrow$  15:85:0.1 in 120 min) to give 53 mg (0.17 mmol, 43%) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>; MW 315; **mp**: 118-119 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.92 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 7.6 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.26 (dt, *J* = 6.6 Hz, 3.3 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 10.8 Hz, 8.9 Hz, 1H), 7.04-7.00 (m, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J* = 7.6 Hz, 2.9 Hz, 1H), 6.68 (ddd, *J* = 8.8 Hz, 3.6 Hz, 2.9 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  163.9 (d, *J* = 0.9 Hz), 152.0 (d, *J* = 2.4 Hz), 151.3 (d, *J* = 2.8 Hz), 150.6 (d, *J* = 246.6 Hz), 149.4 (d, *J* = 236.3 Hz), 146.3 (d, *J* = 14.0 Hz), 146.2 (d, *J* = 14.6 Hz), 141.3, 128.2 (d, *J* = 8.9 Hz), 125.0 (d, *J* = 4.7 Hz), 121.7 (d, *J* = 1.8 Hz), 119.9 (d, *J* = 10.9 Hz), 118.9 (d, *J* = 3.1 Hz), 116.8 (d, *J* = 20.0 Hz), 113.2 (d, *J* = 6.8 Hz), 111.8 (d, *J* = 3.0 Hz), 111.1; **IR**: 3131, 1597, 1575, 1446, 1272, 1251, 1160 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 316 (M+H)<sup>+</sup>; **Elemental analysis** calculated (%) for C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>·1.6 H<sub>2</sub>O: C 59.34, H 4.16, N 4.07. Found: C 59.17, H 3.93, N 4.32; **HPLC** analysis: retention time = 11.72 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

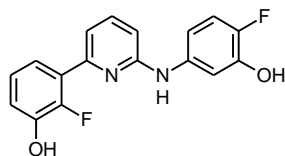
### 6-Bromo-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-amine (**5.2b**).



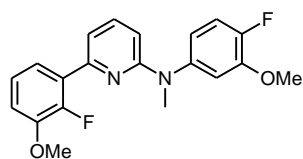
A mixture of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (237 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq), 4-fluoro-3-methoxyaniline (**5.2c**) (155 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) and lithium bis(trimethylsilyl)amide (1 M in tetrahydrofuran, 1.5 ml, 1.5 eq) in anhydrous 1,4-dioxane (1.5 ml) was stirred for 3 h under argon. The mixture was quenched with saturated sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 184 mg (0.62 mmol, 62%) of the analytically pure compound. C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>BrFN<sub>2</sub>O; MW 297; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.32 (dd, *J* = 8.1 Hz, 7.7 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 7.6 Hz, 2.6 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 11.0 Hz, 8.6 Hz, 1H), 6.89 (dd, *J* = 7.6 Hz, 0.4 Hz, 1H), 6.74 (ddd, *J* = 8.6 Hz, 3.7 Hz, 2.6 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 8.3 Hz, 0.4 Hz, 1H), 6.62 (bs, 1H), 3.89 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  156.5, 149.3 (d, *J* = 242.9 Hz), 148.2 (d, *J* = 11.5 Hz), 140.0, 140.0, 135.8 (d, *J* = 3.3 Hz), 118.2, 116.4 (d, *J* = 19.3 Hz), 113.7 (d, *J* = 6.7 Hz), 107.8 (d, *J* = 2.1 Hz), 106.3, 56.4; **MS** (ESI): 297, 299 (M+H)<sup>+</sup>.

**6-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)-N-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-amine (5.2a).**


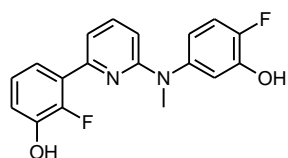
According to **method 5.A** the title compound was prepared by reaction of 6-bromo-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-amine (**5.2b**) (167 mg, 0.56 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (114 mg, 0.67 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 154 mg (0.45 mmol, 80%) of the analytically pure compound.  $C_{19}H_{16}F_2N_2O_2$ ; MW 342;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.60 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.54 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.6 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.37 (dd,  $J$  = 7.6 Hz, 2.6 Hz, 1H), 7.24 (ddd,  $J$  = 7.5 Hz, 2.3 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.17 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.06-6.98 (m, 2H), 6.78 (ddd,  $J$  = 8.6 Hz, 3.5 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.73 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 0.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  155.9, 151.5 (d,  $J$  = 2.0 Hz), 150.5 (d,  $J$  = 250.1 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 240.7 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 11.4 Hz), 147.8 (d,  $J$  = 11.4 Hz), 138.3, 137.1 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 128.4 (d,  $J$  = 9.3 Hz), 123.9 (d,  $J$  = 4.9 Hz), 120.0 (d,  $J$  = 2.4 Hz), 116.0 (d,  $J$  = 19.2 Hz), 115.9 (d,  $J$  = 8.4 Hz), 113.3 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 112.2 (d,  $J$  = 6.5 Hz), 107.8, 106.6 (d,  $J$  = 1.7 Hz), 56.5, 56.2; **MS** (ESI): 343 ( $M+H$ ) $^+$ .

**2-Fluoro-3-{6-[(4-fluoro-3-hydroxyphenyl)amino]pyridin-2-yl}phenol (5.2).**


According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of 6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-amine (**5.2a**) (72 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (2.1 ml, 2.1 mmol, 10.0 eq) in dichloromethane (4.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 41 mg (0.13 mmol, 62%) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_{12}F_2N_2O_2$ ; MW 314; **mp**: 70-71 °C;  $^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  9.96 (bs, 3H), 7.52 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 7.4 Hz, 1H), 7.33 (ddd,  $J$  = 8.0 Hz, 6.7 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.20 (dd,  $J$  = 11.2 Hz, 8.6 Hz, 1H), 7.09-7.03 (m, 2H), 6.99 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.8 Hz, 1H), 6.89 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.75 (ddd,  $J$  = 8.6 Hz, 3.9 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.47 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 0.5 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR ( $DMSO-d_6$ , 125 MHz):  $\delta$  158.2 (d,  $J$  = 37.6 Hz), 157.7, 149.3 (d,  $J$  = 245.8 Hz), 149.0 (d,  $J$  = 239.8 Hz), 145.7 (d,  $J$  = 13.2 Hz), 145.5 (d,  $J$  = 13.1 Hz), 142.4 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 137.7, 128.1 (d,  $J$  = 10.1 Hz), 124.0 (d,  $J$  = 4.5 Hz), 120.0 (d,  $J$  = 1.9 Hz), 117.6 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 117.2 (d,  $J$  = 6.8 Hz), 116.8 (d,  $J$  = 19.3 Hz), 115.8 (d,  $J$  = 4.1 Hz), 113.3 (d,  $J$  = 9.8 Hz), 107.6; **IR**: 3092, 1577, 1510, 1449, 1288, 1235, 1163, 778  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 315 ( $M+H$ ) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 11.36 min; peak area, 98.6%, HPLC-method B.

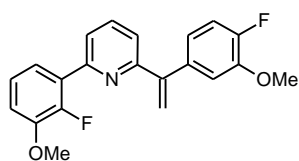
**6-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-*N*-methylpyridin-2-amine (5.3a).**


According to **method 5.C** the title compound was prepared by methylation of 6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-amine (**5.2a**) (154 mg, 0.45 mmol, 1.0 eq) in dimethylformamide (2.5 ml) overnight. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 145 mg (0.41 mmol, 91%) of the analytically pure compound. C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; MW 356; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.64 (ddd,  $J$  = 8.2 Hz, 6.7 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.41 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 7.5 Hz, 1H), 7.18 (ddd,  $J$  = 4.9 Hz, 2.4 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.16 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.11 (dd,  $J$  = 11.1 Hz, 8.6 Hz, 1H), 6.99 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.92 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 2.5 Hz, 1H), 6.83 (ddd,  $J$  = 8.6 Hz, 3.9 Hz, 2.5 Hz, 1H), 6.44 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 0.6 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.53 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  158.5, 151.0 (d,  $J$  = 250.3 Hz), 150.8 (m), 150.5 (d,  $J$  = 244.8 Hz), 148.5 (d,  $J$  = 11.6 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 11.6 Hz), 143.2 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 137.4, 123.8 (d,  $J$  = 4.9 Hz), 122.2 (d,  $J$  = 2.4 Hz), 119.1 (d,  $J$  = 6.8 Hz), 116.8 (d,  $J$  = 19.1 Hz), 114.2 (d,  $J$  = 10.4 Hz), 113.2 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 112.4 (d,  $J$  = 2.5 Hz), 108.1, 56.6, 56.4, 38.7; MS (ESI): 357 (M+H)<sup>+</sup>.

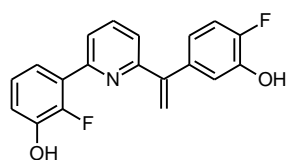
**2-Fluoro-3-{6-[(4-fluoro-3-hydroxyphenyl)(methyl)amino]pyridin-2-yl}phenol trifluoroacetate salt (5.3).**


According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of 6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-*N*-methylpyridin-2-amine (**5.3a**) (121 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.4 ml, 3.4 mmol, 10.0 eq) in dichloromethane (7.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) and preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 15:85:0.1  $\rightarrow$  5:95:0.1 in 160 min) to give 60 mg (0.14 mmol, 40%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·TFA; MW: 442; mp: 58-59 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.84 (bs, 3H), 7.65 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 7.5 Hz, 1H), 7.47-7.39 (m, 1H), 7.22 (dd,  $J$  = 10.9 Hz, 8.7 Hz, 1H), 7.17 (ddd,  $J$  = 7.4 Hz, 2.0 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.13-7.02 (m, 3H), 6.88 (ddd,  $J$  = 8.7 Hz, 3.9 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.66 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 3.53 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  158.0, 150.9 (d,  $J$  = 240.4 Hz), 150.5 (d,  $J$  = 245.1 Hz), 149.8, 146.9 (d,  $J$  = 14.1 Hz), 146.3 (d,  $J$  = 13.7 Hz), 142.9 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 139.8, 127.7 (d,  $J$  = 9.6 Hz), 125.1 (d,  $J$  = 4.6 Hz), 121.7 (d,  $J$  = 1.7 Hz), 119.1 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 119.0 (d,  $J$  = 6.7 Hz), 117.9 (d,  $J$  = 19.4 Hz), 117.2 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 114.5 (d,  $J$  = 8.2 Hz), 109.7, 39.3; IR: 3093, 1673, 1633, 1182, 1134, 778 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 329 (M+H)<sup>+</sup>. **Elemental analysis** calculated (%) for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·TFA·1.8 H<sub>2</sub>O: C 50.60, H 3.95, N 5.90. Found: C 50.39, H 3.59, N 6.03; **HPLC** analysis: retention time = 11.70 min; peak area, 99.9%, HPLC-method B.



**2-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)-6-[1-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)ethenyl]pyridine (5.4a).**


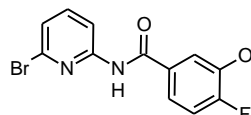
To a solution of methylphenylphosphonium bromide (377 mg, 1.06 mmol, 1.2 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (2.0 ml), *n*-BuLi (0.4 ml, 2.5 M in hexane, 1.1 eq) was added dropwise at 0 °C. After stirring for 1 h at 0 °C a solution of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-pyridin-2-yl]methanone (**3.8a**) (312 mg, 0.88 mmol, 1.0 eq) in anhydrous tetrahydrofuran (2.0 ml) was added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, quenched with saturated ammonium chloride and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 24:1) to give 231 mg (0.65 mmol, 74%) of the analytically pure compound. C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>; MW 353; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.77-7.69 (m, 2H), 7.57 (ddd, *J* = 8.2 Hz, 6.7 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 6.8 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.17 (dt, 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 11.1 Hz, 8.3 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.3 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.01 (dt, *J* = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 6.94 (ddd, *J* = 8.3 Hz, 4.4 Hz, 2.1 Hz, 1H), 6.15 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.87 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  157.8, 152.8 (d, *J* = 1.9 Hz), 152.3 (d, *J* = 246.4 Hz), 150.9 (d, *J* = 250.0 Hz), 148.3, 148.3 (d, *J* = 11.5 Hz), 147.4 (d, *J* = 12.3 Hz), 137.0, 137.0, 128.3 (d, *J* = 9.3 Hz), 124.1 (d, *J* = 4.9 Hz), 123.6 (d, *J* = 9.6 Hz), 122.4 (d, *J* = 2.3 Hz), 121.6, 121.3 (d, *J* = 6.9 Hz), 118.3, 115.8 (d, *J* = 18.4 Hz), 114.0 (d, *J* = 2.2 Hz), 113.7 (d, *J* = 2.3 Hz), 56.6, 56.4; MS (ESI): 354 (M+H)<sup>+</sup>.

**2-Fluoro-3-{6-[1-(4-fluoro-3-hydroxyphenyl)-ethenyl]pyridin-2-yl}phenol (5.4).**


According to **method 5.B2** the title compound was prepared by reaction of 2-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-6-[1-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)ethenyl]pyridine (**5.4a**) (84 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with boron trifluoride dimethylsulfide complex (1.75 ml, 16.7 mmol, 70 eq) in dichloromethane (5.0 ml). The crude product was extracted with dichloromethane and purified by preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 80:20:0.1  $\rightarrow$  35:65:0.1 in 120 min) to give 43 mg (0.11 mmol, 46%) of the title compound containing 0.5 eq trifluoroacetic acid. C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>; MW 325; mp: 84-85 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.83 (bs, 2H), 7.96 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.82 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 2.3 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.46-7.41 (m, 1H), 7.40 (dd, *J* = 7.8 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.16-7.07 (m, 3H), 7.06 (dd, *J* = 8.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 6.90 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 4.3 Hz, 2.3 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 5.64 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  158.4, 153.3 (d, *J* = 9.1 Hz), 152.1 (d, *J* = 234.1 Hz), 150.6 (d, *J* = 244.9 Hz), 148.7, 146.3 (d, *J* = 13.8 Hz), 145.4 (d, *J* = 13.2 Hz), 138.8, 137.8 (d, *J* = 5.0 Hz), 128.6 (d, *J* = 9.2 Hz), 125.1 (d, *J* = 4.6 Hz), 124.3 (d, *J* = 8.9 Hz), 122.7, 122.1 (d, *J* = 1.7 Hz), 120.9 (d, *J* = 6.7 Hz), 119.2 (d, *J* = 3.1 Hz), 118.7 (d, *J* = 3.1 Hz), 118.5 (d, *J* = 1.4 Hz), 116.6 (d, *J* = 18.6 Hz); IR: 3097, 1670, 1191, 784, 722 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 326 (M+H)<sup>+</sup>; **Elemental analysis** calculated (%) for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>·0.5 TFA·0.5 H<sub>2</sub>O: C 61.38,

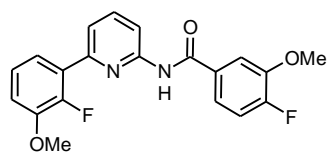
H 3.73, N 3.58. Found: C 61.41, H 3.84, N 3.80; **HPLC** analysis: retention time = 7.30 min; peak area, 97.8%, HPLC-method A.

#### ***N*-(6-Bromopyridin-2-yl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (5.5b).**



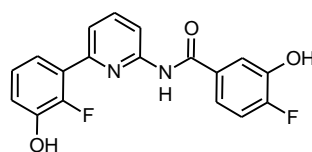
According to **method 5.D** the title compound was prepared by reaction of 4-fluoro-3-methoxybenzoic acid (340 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) with 6-bromopyridin-2-amine (346 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 12:1) to give 499 mg (1.54 mmol, 77%) of the analytically pure compound. C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>BrFN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; MW 325; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.54 (bs, 1H), 8.33 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.63 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.57 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.42 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.1 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.29-7.25 (m, 1H), 7.18 (dd,  $J$  = 10.5 Hz, 8.4 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  164.7, 155.2 (d,  $J$  = 254.2 Hz), 151.6, 148.4 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 141.0, 139.4, 130.3 (d,  $J$  = 3.8 Hz), 124.0, 119.8 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 116.4 (d,  $J$  = 19.3 Hz), 113.0 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 112.6, 56.5; **MS** (ESI): 325, 327 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4-Fluoro-*N*-[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]-3-methoxybenzamide (5.5a).**



According to **method 5.A** the title compound was prepared by reaction of *N*-(6-bromopyridin-2-yl)-4-fluoro-3-methoxybenzamide (**5.5b**) (316 mg, 0.97 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (198 mg, 1.17 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 250 mg (0.68 mmol, 70%) of the analytically pure compound. C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; MW 370; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.73 (bs, 1H), 8.35 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.86 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.61 (dd,  $J$  = 8.1 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.55 (ddd,  $J$  = 7.7 Hz, 2.4 Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.44 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.2 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.43-7.38 (m, 1H), 7.17 (dt,  $J$  = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J$  = 10.6 Hz, 8.4 Hz, 1H), 7.02 (dt,  $J$  = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.94 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  164.9 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 155.0 (d,  $J$  = 253.5 Hz), 151.3, 150.5 (d,  $J$  = 250.5 Hz), 148.4 (d,  $J$  = 14.7 Hz), 148.3 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 139.3 (m), 130.9 (d,  $J$  = 4.5 Hz), 124.2 (d,  $J$  = 5.0 Hz), 121.8 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 121.1 (d,  $J$  = 8.7 Hz), 119.8 (d,  $J$  = 0.8 Hz), 119.7 (d,  $J$  = 0.8 Hz), 116.2 (d,  $J$  = 19.3 Hz), 113.9 (d,  $J$  = 2.1 Hz), 113.2, 113.1 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 56.6, 56.5; **MS** (ESI): 371 (M+H)<sup>+</sup>.

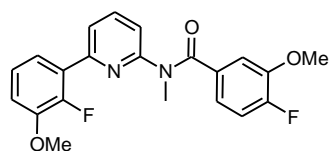
#### **4-Fluoro-*N*-[6-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]-3-hydroxybenzamide (5.5).**



According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of 4-fluoro-*N*-[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]-3-methoxybenzamide (**5.5a**) (64 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (2.6 ml, 2.6 mmol, 15.0 eq) in dichloromethane (3.5 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) to give 34 mg

(0.10 mmol, 58%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; MW 342; **mp**: 234-235 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.80 (bs, 1H), 9.06 (bs, 1H), 8.79 (bs, 1H), 8.32 (dd, *J* = 8.3 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.79-7.73 (m, 1H), 7.66 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 4.2 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.61-7.55 (m, 1H), 7.45-7.38 (m, 1H), 7.26 (dd, *J* = 10.7 Hz, 8.54 Hz, 1H), 7.14-7.03 (m, 2H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  165.7, 154.7 (d, *J* = 246.7 Hz), 153.0, 152.6 (d, *J* = 2.0 Hz), 150.6 (d, *J* = 244.9 Hz), 146.4 (d, *J* = 14.0 Hz), 145.8 (d, *J* = 13.4 Hz), 139.5, 132.3 (d, *J* = 3.5 Hz), 128.7 (d, *J* = 9.3 Hz), 124.9 (d, *J* = 4.7 Hz), 121.9 (d, *J* = 1.8 Hz), 120.8 (d, *J* = 9.7 Hz), 120.7 (d, *J* = 7.6 Hz), 118.9 (d, *J* = 3.1 Hz), 118.6 (d, *J* = 4.1 Hz), 116.8 (d, *J* = 19.3 Hz), 113.9; **IR**: 3350, 1672, 1594, 1573, 1553, 1446, 780 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 343 (M+H)<sup>+</sup>. **HPLC** analysis: retention time = 14.32 min; peak area, 99.7%, HPLC-method B.

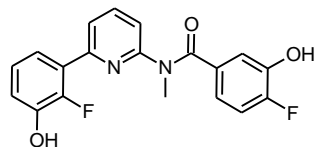
#### 4-Fluoro-*N*-[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]-3-methoxy-*N*-methylbenzamide (5.6a).



According to **method 5.C** the title compound was prepared by methylation of 4-fluoro-*N*-[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]-3-methoxy benzamide (**5.5a**) (233 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq) in dimethylformamide (4.0 ml) for 4 h. The crude product was purified by

column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:2) to give 147 mg (0.38 mmol, 61%) of the analytically pure compound. C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; MW 384; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.60-7.54 (m, 2H), 7.25 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 6.6 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.15 (dt, *J* = 8.0 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.06-6.99 (m, 2H), 6.94-6.88 (m, 2H), 6.81-6.76 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.64 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  170.1, 156.7, 153.4 (d, *J* = 250.9 Hz), 152.5 (d, *J* = 1.9 Hz), 150.7 (d, *J* = 250.6 Hz), 148.4 (d, *J* = 11.2 Hz), 147.4 (d, *J* = 11.0 Hz), 138.3, 132.5 (d, *J* = 4.1 Hz), 127.3 (d, *J* = 9.1 Hz), 124.2 (d, *J* = 5.0 Hz), 121.9 (d, *J* = 5.8 Hz), 121.9 (d, *J* = 5.2 Hz), 121.8 (d, *J* = 5.1 Hz), 119.8, 115.7 (d, *J* = 19.0 Hz), 114.2 (d, *J* = 2.9 Hz), 113.9 (d, *J* = 2.4 Hz), 56.6, 56.2, 36.3; **MS** (ESI): 385 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-Fluoro-*N*-[6-(2-fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]-3-hydroxy-*N*-methylbenzamide (5.6).



According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of 4-fluoro-*N*-[6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl]-3-methoxy-*N*-methylbenzamide (**5.6a**) (133 mg, 0.35 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (5.2 ml, 5.2 mmol, 15.0 eq) in dichloromethane (7.0 ml). The

crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:2) to give 31 mg (0.09 mmol, 25%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; MW 356; **mp**: 159-160 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.79 (bs, 1H), 8.71 (bs, 1H), 7.76 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.61-7.55 (m, 1H), 7.17-7.10 (m, 2H), 7.10-7.03 (m, 3H), 7.00 (dd, *J* = 10.9 Hz, 8.4 Hz, 1H), 6.84 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 4.3 Hz, 2.1 Hz, 1H), 3.54 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  170.4, 157.7, 153.2 (d, *J* = 244.5 Hz), 152.9 (d, *J* = 4.4 Hz), 150.7 (d, *J* = 244.8 Hz), 146.4 (d, *J* = 14.2 Hz), 145.5 (d, *J* = 14.2 Hz), 139.3, 134.7 (d, *J* = 3.9 Hz), 128.4 (d, *J* = 9.1 Hz), 125.0 (d, *J* = 4.7 Hz), 121.9 (m),

121.4 (d,  $J = 7.3$  Hz), 119.9, 119.1 (m), 116.4 (d,  $J = 19.2$  Hz), 36.1; **IR**: 3170, 1628, 1557, 1449, 1420, 1377, 1337, 790, 778, 750, 736  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 357 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 14.15 min; peak area, 97.6%, HPLC-method B.

#### 6-Bromo-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine-2-carboxamide (**5.7b**).

According to **method 5.D** the title compound was prepared by reaction of 6-bromopyridine-2-carboxylic acid (341 mg, 1.69 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxyaniline (238 mg, 1.69 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 4:1) to give 468 mg (1.44 mmol, 85%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrFN}_2\text{O}_2$ ; MW 325;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.64 (bs, 1H), 8.23 (dd,  $J = 7.6$  Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.78 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.70 (dd,  $J = 7.7$  Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J = 7.9$  Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.10 (ddd,  $J = 7.7$  Hz, 3.9 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.09-7.01 (m, 1H), 3.94 (s, 3H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  160.6, 150.9, 149.4 (d,  $J = 243.5$  Hz), 147.9 (d,  $J = 11.4$  Hz), 140.6, 140.2, 133.9 (d,  $J = 3.3$  Hz), 131.3, 121.6, 116.1 (d,  $J = 19.4$  Hz), 112.0 (d,  $J = 6.7$  Hz), 105.9 (d,  $J = 1.8$  Hz), 56.4; **MS** (ESI): 325, 327 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

#### 6-(2-Fluoro-3-methoxyphenyl)-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine-2-carboxamide (**5.7a**).

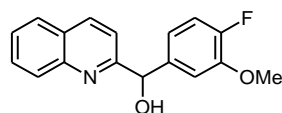
According to **method 5.A** the title compound was prepared by reaction of 6-bromo-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine-2-carboxamide (**5.7b**) (456 mg, 1.40 mmol, 1.0 eq) with 2-fluoro-3-methoxyphenylboronic acid (286 mg, 1.68 mmol, 1.2 eq) in DME/water (15.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 4:1) to give 476 mg (1.29 mmol, 92%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3$ ; MW 371;  **$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  10.04 (s, 1H), 8.26 (dd,  $J = 7.6$  Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.99 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.93 (ddd,  $J = 7.9$  Hz, 2.1 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.80 (dd,  $J = 7.8$  Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.47 (ddd,  $J = 8.0$  Hz, 6.6 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.24 (dt,  $J = 8.0$  Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.09 (dt,  $J = 8.0$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.08-7.02 (m, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.95 (s, 3H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  162.0, 152.3 (d,  $J = 1.9$  Hz), 150.7 (d,  $J = 251.1$  Hz), 149.6, 149.2 (d,  $J = 243.0$  Hz), 148.5 (d,  $J = 11.1$  Hz), 147.9 (d,  $J = 11.4$  Hz), 138.5, 134.3 (d,  $J = 3.3$  Hz), 127.5 (d,  $J = 8.1$  Hz), 127.4 (d,  $J = 9.4$  Hz), 124.4 (d,  $J = 5.0$  Hz), 121.9 (d,  $J = 1.9$  Hz), 121.2, 116.0 (d,  $J = 19.4$  Hz), 114.1 (d,  $J = 2.4$  Hz), 111.8 (d,  $J = 6.7$  Hz), 105.9 (d,  $J = 1.7$  Hz), 56.6, 56.4; **MS** (ESI): 371 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

#### 6-(2-Fluoro-3-hydroxyphenyl)-*N*-(4-fluoro-3-hydroxyphenyl)pyridine-2-carboxamide (**5.7**).

According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of 6-(2-fluoro-3-methoxyphenyl)-*N*-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)pyridine-2-carboxamide (**5.7a**) (107 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide

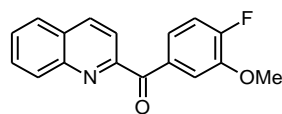
(4.7 ml, 4.7 mmol, 15.0 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 71 mg (0.21 mmol, 67%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; MW 342; **mp**: 223-224 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  10.31 (bs, 1H), 8.83 (bs, 2H), 8.23 (dd, *J* = 7.7 Hz, 1.1 Hz, 1H), 8.17 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.03 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 2.3 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.77 (dd, *J* = 8.1 Hz, 2.6 Hz, 1H), 7.55 (ddd, *J* = 7.7 Hz, 6.7 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.31 (ddd, *J* = 8.8 Hz, 3.8 Hz, 2.7 Hz, 1H), 7.20-7.12 (m, 2H), 7.10 (dd, *J* = 10.9 Hz, 8.8 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz):  $\delta$  162.7, 153.2 (d, *J* = 1.9 Hz), 151.0, 150.6 (d, *J* = 245.1 Hz), 148.9 (d, *J* = 237.2 Hz), 146.4 (d, *J* = 13.7 Hz), 145.6 (d, *J* = 13.7 Hz), 139.5, 136.0 (d, *J* = 3.0 Hz), 128.2 (d, *J* = 9.1 Hz), 128.0 (d, *J* = 8.6 Hz), 125.4 (d, *J* = 4.8 Hz), 122.2 (d, *J* = 1.8 Hz), 121.8, 119.5 (d, *J* = 3.2 Hz), 116.6 (d, *J* = 19.4 Hz), 112.2 (d, *J* = 6.4 Hz), 110.6 (d, *J* = 2.5 Hz); **IR**: 3125, 1676, 1558, 1448, 752, 714 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 343 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 16.24 min; peak area, 99.9%, HPLC-method B.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(quinolin-2-yl)methanol (5.8b).**

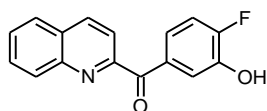


According to **method 5.E1** the title compound was prepared by reaction of 2-bromoquinoline (418 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (340 mg, 2.2 mmol, 1.1 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1  $\rightarrow$  4:1) to give 379 mg (1.34 mmol, 67%) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>2</sub>; MW: 283; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.77 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 7.0 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.61-7.54 (m, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 11.1 Hz, 8.2 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.2 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.96 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 4.4 Hz, 2.1 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 3.83 (s, 3H); **MS** (ESI): 284 (M+H)<sup>+</sup>.

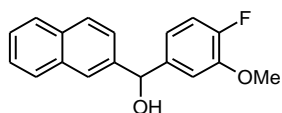
**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(quinolin-2-yl)methanone (5.8a).**



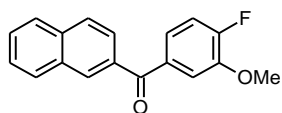
According to **method 5.F** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(quinolin-2-yl)methanol (**5.8b**) (364 mg, 1.29 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (430 mg, 1.54 mmol, 1.2 eq) for 1.5 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 256 mg (0.91 mmol, 71%) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>2</sub>; MW: 281; **mp**: 138-139 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.94-7.84 (m, 2H), 7.78 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 6.9 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.70-7.61 (m, 1H), 7.22-7.11 (m, 1H), 3.97 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  192.1, 155.9 (d, *J* = 255.7 Hz), 154.7, 147.8 (d, *J* = 11.0 Hz), 146.8, 137.4, 132.7 (d, *J* = 3.5 Hz), 130.6, 130.4, 129.1, 128.7, 127.9, 126.3 (d, *J* = 8.0 Hz), 121.0, 116.0 (d, *J* = 2.1 Hz), 115.8 (d, *J* = 18.9 Hz), 56.4; **IR**: 1658, 1512, 773, 763 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 282 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 15.36 min; peak area, 99.0%, HPLC-method B.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)(quinolin-2-yl)methanone (5.8).**

According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(quinolin-2-yl)methanone (**5.8a**) (84 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.5 ml, 1.5 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 66 mg (0.25 mmol, 82%) of the analytically pure compound.  $C_{16}H_{10}FNO_2$ ; MW: 267; **mp**: 169-170 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9.07 (s, 1H), 8.57 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.17-8.13 (m, 1H), 8.10-8.04 (m, 2H), 7.99 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.88 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 6.9 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.81 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.75 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 6.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.29 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  191.5, 155.0, 154.7 (d,  $J$  = 249.6 Hz), 146.6, 144.7 (d,  $J$  = 13.0 Hz), 137.5, 133.2 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 130.4, 130.2, 129.0, 128.6, 128.0, 124.2 (d,  $J$  = 7.6 Hz), 120.8 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 120.6, 115.8 (d,  $J$  = 19.2 Hz); **IR**: 3408, 1654, 1594, 1525, 1434, 1426, 1319, 766  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 268 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 11.55 min; peak area, 96.1%, HPLC-method A.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(naphthalen-2-yl)methanol (5.9b).**

According to **method 5.E1** the title compound was prepared by reaction of 2-bromonaphthalene (415 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (474 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 447 mg (1.59 mmol, 79%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{15}FO_2$ ; MW: 282;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.89-7.78 (m, 4H), 7.51-7.47 (m, 2H), 7.41 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.07 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.03 (dd,  $J$  = 11.0 Hz, 8.3 Hz, 1H), 6.91 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 4.3 Hz, 2.1 Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.86 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  151.9 (d,  $J$  = 245.6 Hz), 147.8 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 140.9, 140.0 (d,  $J$  = 3.8 Hz), 133.3, 133.0, 128.6, 128.2, 127.8, 126.4, 126.3, 125.2, 124.7, 119.2 (d,  $J$  = 7.1 Hz), 115.9 (d,  $J$  = 18.5 Hz), 111.8 (d,  $J$  = 2.3 Hz), 76.0, 56.3; **MS** (ESI): 283 (M+H) $^+$ .

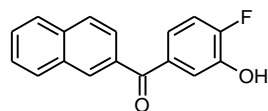
**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(naphthalen-2-yl)methanone (5.9a).**

According to **method 5.F** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(naphthalen-2-yl)methanol (**5.9b**) (447 mg, 1.58 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (664 mg, 2.37 mmol, 1.5 eq) for 4.5 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 7:1) to give 272 mg (0.97 mmol, 61%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{13}FO_2$ ; MW: 280;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.25 (s, 1H), 7.98-7.88 (m, 4H), 7.66-7.55 (m, 3H), 7.39 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 4.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.3 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  195.5, 155.4 (d,  $J$  = 254.4 Hz), 148.1 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 135.4, 134.9, 134.4 (d,  $J$  = 3.7 Hz), 132.3,



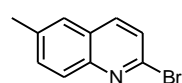
131.7, 129.5, 128.5, 128.5, 128.0, 127.1, 125.8, 124.4 (d,  $J = 7.9$  Hz), 115.7 (d,  $J = 19.0$  Hz), 114.7 (d,  $J = 3.3$  Hz), 56.5; **MS** (ESI): 281 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)(naphthalen-2-yl)methanone (5.9).**

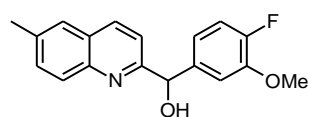


According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(naphthalen-2-yl)methanone (**5.9a**) (272 mg, 0.97 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (4.9 ml, 4.9 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (10.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 220 mg (0.83 mmol, 85%) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>FO<sub>2</sub>; MW: 266; **mp**: 148-149 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.24 (s, 1H), 7.95-7.86 (m, 4H), 7.64-7.52 (m, 3H), 7.39 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 4.7 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.19 (dd,  $J = 10.1$  Hz, 8.5 Hz, 1H); **<sup>13</sup>C NMR** (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  195.8, 154.0 (d,  $J = 246.7$  Hz), 143.9 (d,  $J = 14.4$  Hz), 135.4, 134.8 (d,  $J = 4.9$  Hz), 134.6, 132.3, 132.0, 129.6, 128.6, 128.5, 128.0, 127.0, 125.8, 123.7 (d,  $J = 7.6$  Hz), 119.6 (d,  $J = 3.5$  Hz), 115.8 (d,  $J = 19.1$  Hz); **IR**: 3186, 1642, 1588, 1315, 1188, 772, 762 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 267 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 13.74 min; peak area, 98.0%, HPLC-method A.

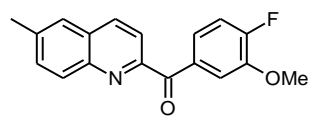
**2-Bromo-6-methylquinoline (5.10c).**



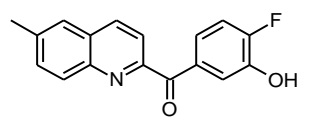
To a solution of 6-methylquinoline (270  $\mu$ L, 2.0 mmol, 1.0 eq) in dry dichloromethane (4.0 ml), *m*-chloroperbenzoic acid (690 mg, 4.0 mmol, 2.0 eq) was added at 0 °C under argon. The mixture was stirred overnight at room temperature, then diluted with dichloromethane and washed with potassium hydroxide (6 M). The organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. A mixture of the residue, molecular sieve (4 Å) and tetrabutylammonium bromide (967 mg, 3.0 mmol, 1.5 eq) in dry dichloromethane (200 ml) was stirred for 10 min at room temperature. *p*-toluenesulfonic anhydride (979 mg, 3.0 mmol, 1.5 eq) was added and stirring was continued at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/chloroform 10:1  $\rightarrow$  5:1  $\rightarrow$  1:1) to give 297 mg (1.34 mmol, 67%) of the analytically pure compound. C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>BrN; MW: 222; **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.99-7.87 (m, 2H), 7.62-7.53 (m, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.54$  Hz, 1H), 2.52 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  147.3, 140.9, 137.9, 137.3, 132.9, 128.4, 127.1, 126.7, 125.8, 21.7.; **MS** (ESI): 223 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(6-methylquinolin-2-yl)methanol (5.10b).**


According to **method 5.E1** the title compound was prepared by reaction of 2-bromo-6-methylquinoline (**5.10c**) (287 mg, 1.29 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (199 mg, 1.29 mmol, 1.0 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1 $\rightarrow$ 8:1 $\rightarrow$ 2:1) to give 280 mg (0.94 mmol, 73%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>2</sub>; MW: 297; **MS** (ESI): 298 (M+H)<sup>+</sup>.

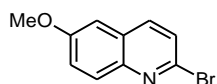
**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(6-methylquinolin-2-yl)methanone (5.10a).**


According to **method 5.F** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(6-methylquinolin-2-yl)methanol (**5.10b**) (280 mg, 0.94 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (395 mg, 1.41 mmol, 1.5 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1) to give 141 mg (0.48 mmol, 51%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>2</sub>; MW: 295; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.26 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 7.99 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.90 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.63 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 2.59 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  192.1, 155.8 (d,  $J$  = 255.4 Hz), 153.9, 147.7 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 145.4, 139.1, 136.6, 132.8 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 132.7, 130.2, 129.2, 126.7, 126.3 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 121.1, 116.0 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 115.7 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 56.4, 22.0; **MS** (ESI): 296 (M+H)<sup>+</sup>.

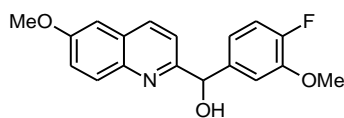
**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)(6-methylquinolin-2-yl)methanone (5.10).**


According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(6-methylquinolin-2-yl)methanone (**5.10a**) (128 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (4.3 ml, 4.3 mmol, 10.0 eq) in dichloromethane (8.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1) to give 118 mg (0.42 mmol, 97%) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>2</sub>; MW: 281; **mp**: 165-166 °C; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.04 (s, 1H), 8.44 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.85-7.82 (m, 1H), 7.81 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.72 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.28 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 2.58 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  192.3, 155.5 (d,  $J$  = 249.5 Hz), 154.9, 146.0, 145.4 (d,  $J$  = 13.1 Hz), 139.8, 137.5, 134.2 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 133.4, 130.7, 129.9, 127.5, 125.0 (d,  $J$  = 7.6 Hz), 121.6 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 121.5, 116.6 (d,  $J$  = 19.2 Hz), 21.7; **IR**: 2920, 1663, 1566, 1362, 1214, 1200, 840, 816, 791 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 282 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 12.97 min; peak area, 98.5%, HPLC-method A.

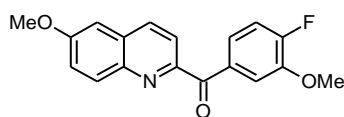


**2-Bromo-6-methoxyquinoline (5.11c)**<sup>8</sup>

To a solution of 6-methoxyquinoline (319 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) in dry dichloromethane (4.0 ml), *m*-chloroperbenzoic acid (690 mg, 4.0 mmol, 2.0 eq) was added at 0 °C under argon. The mixture was stirred overnight at room temperature, then diluted with dichloromethane and washed with potassium hydroxide (6 M). The organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. A mixture of the residue, molecular sieve (4 Å) and tetrabutylammonium bromide (967 mg, 3.0 mmol, 1.5 eq) in dry dichloromethane (200 ml) was stirred for 10 min at room temperature. *p*-toluenesulfonic anhydride (979 mg, 3.0 mmol, 1.5 eq) was added and stirring was continued at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1→2:1) to give 224 mg (0.94 mmol, 47%) of the analytically pure compound. C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>BrNO; MW: 238; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.93 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 9.3 Hz, 2.8 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H); MS (ESI): 239 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(6-methoxyquinolin-2-yl)methanol (5.11b).**

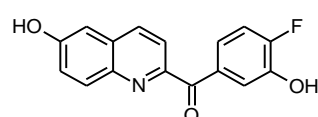
According to **method 5.E1** the title compound was prepared by reaction of 2-bromo-6-methoxyquinoline (5.11c) (214 mg, 0.90 mmol, 1.0 eq) with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (154 mg, 1.00 mmol, 1.1 eq). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 10:1→1:1) to give 117 mg (0.37 mmol, 42%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>3</sub>; MW: 313; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.04 (d, *J* = 9.08 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.49 Hz, 1H), 7.41 (ddd, *J* = 9.2 Hz, 2.8 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.04 (dd, *J* = 11.0 Hz, 8.2 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 8.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.95 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 4.3 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.07 (bs, 1H), 5.81 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.83 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  158.1, 157.8, 157.7, 152.3 (d, *J* = 250.4 Hz), 148.0 (d, *J* = 11.0 Hz), 141.8, 139.4 (d, *J* = 3.9 Hz), 136.3 (d, *J* = 2.8 Hz), 130.1, 128.7, 122.8 (d, *J* = 1.9 Hz), 120.0 (d, *J* = 7.2 Hz), 119.5, 116.0 (d, *J* = 18.6 Hz), 112.3 (d, *J* = 2.4 Hz), 105.4, 56.3, 55.7; MS (ESI): 314 (M+H)<sup>+</sup>.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(6-methoxyquinolin-2-yl)methanone (5.11a).**

According to **method 5.F** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(6-methoxyquinolin-2-yl)methanol (5.11b) (115 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) with 2-iodoxybenzoic acid (123 mg, 0.44 mmol, 1.2 eq) for 2 h. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1→1:1) to give 84 mg (0.27 mmol, 73%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>3</sub>; MW: 311; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.10

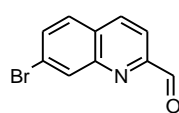
(d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 8.07 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 7.98 (dd,  $J = 8.5$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.91 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 4.6 Hz, 2.0 Hz, 1H); 7.44 (dd,  $J = 9.2$  Hz, 2.8 Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J = 10.8$  Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.97 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  191.9, 159.6, 155.7 (d,  $J = 255.2$  Hz), 152.3, 147.6 (d,  $J = 11.0$  Hz), 142.8, 135.8, 133.0 (d,  $J = 3.5$  Hz), 132.1, 130.5, 126.2 (d,  $J = 7.9$  Hz), 123.5, 121.6, 116.0 (d,  $J = 3.3$  Hz), 115.6 (d,  $J = 18.9$  Hz), 105.0, 56.4, 55.9; **MS** (ESI): 312 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### (4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)(6-hydroxyquinolin-2-yl)methanone (5.11).



According to **method 5.B2** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(6-methoxyquinolin-2-yl)methanone (**5.11a**) (93 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq) with boron trifluoride dimethylsulfide complex (2.2 ml, 21.0 mmol, 70 eq). The crude product was extracted with ethyl acetate and purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) to give 46 mg (0.16 mmol, 54%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{FNO}_3$ ; MW: 283; **mp**: 104-105 °C;  $^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.33 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 8.03 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J = 8.8$  Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.82 (ddd,  $J = 8.5$  Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.50 (dd,  $J = 9.1$  Hz, 2.7 Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.27 (dd,  $J = 10.9$  Hz, 8.5 Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.1 (d,  $J = 1.1$  Hz), 158.4, 155.3 (d,  $J = 249.0$  Hz), 152.8, 145.4 (d,  $J = 13.1$  Hz), 142.7, 136.2, 134.4 (d,  $J = 3.4$  Hz), 132.9, 131.6, 124.9 (d,  $J = 7.6$  Hz), 123.7, 121.7, 121.6 (d,  $J = 6.3$  Hz), 116.5 (d,  $J = 19.1$  Hz), 109.3; **IR**: 3456, 3088, 1653, 1622, 1592, 1427, 1391, 1217  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 284 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 14.04 min; peak area, 99.9%, HPLC-method B.

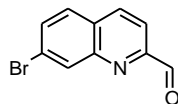
#### 7-Bromoquinoline-2-carbaldehyde (5.12e).



2-Bromoanilin (**5.12f**) (1.72 g, 10.0 mmol, 1.0 eq) was mixed with 5 M hydrochloric acid (7.0 ml). The suspension was heated to 110 °C and crotonaldehyde (0.84 g, 12.0 mmol, 1.2 eq) in toluene (0.7 ml) was added over a period of 1 h at 110 °C. The solution was cooled down to 60 °C, and a solution of zinc chloride (1.36 g, 10.0 mmol, 1.0 eq) in tetrahydrofuran/ acetone (1:1, 3.0 ml) was added and the resulting suspension was stirred for 1 h at 0 °C. The participate was filtered of, washed with cold 5 M hydrochloric acid, tetrahydrofuran, 2-propanole and diethyl ether and dried *in vacuo*. The solid obtained was solved in ammonia (25%, 50 ml) and hexanes (100 ml). The phases were separated and the aqueous phase was extracted with ether. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (neat dichloromethane) to give 674 mg (3.03 mmol, 30%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrN}$ , MW: 222;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.23 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.56 (dd,  $J = 8.6$  Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 2.75

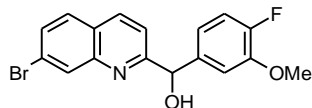
(s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  (ppm) 160.2, 148.2, 136.4, 131.0, 129.5, 128.9, 125.2, 123.8, 122.5, 25.3; MS (ESI): 223, 225 (M+H)<sup>+</sup>.

### 7-Bromoquinoline-2-carbaldehyde (5.12d).<sup>9</sup>



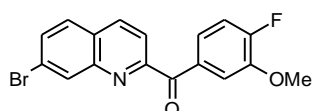
A mixture of 7-bromo-2-methylquinoline (5.12e) (5.80 g, 26.1 mmol, 1.0 eq) and selenium dioxide (3.80 g, 33.9 mmol, 1.3 eq) in 1,4-dioxane (130 ml) was stirred for 5 h at 80 °C. The solvent was removed to dryness under reduced and the crude product was purified by column chromatography (neat dichloromethane) to give 5.93 g (25.1 mmol, 96%) of the analytically pure compound. C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>BrNO, MW: 236;  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  10.21-10.20 (m, 1H), 8.45-8.44 (m, 1H), 8.31-8.29 (m, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.78-7.77 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  193.4, 153.2, 148.5, 137.6, 132.8, 132.7, 129.2, 128.7, 124.9, 117.8; MS (ESI): 237, 239 (M+H)<sup>+</sup>.

### (7-Bromoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanol (5.12c).

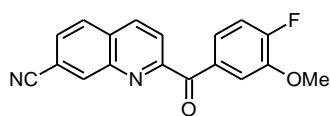


According to **method 5.E2** the title compound was prepared by reaction of 4-bromo-1-fluoro-2-methoxybenzene (5.27 g, 25.7 mmol, 1.2 eq) with 7-bromoquinoline-2-carbaldehyde (5.12d) (5.05 g, 21.4 mmol, 1.0 eq). The crude product was used in the next step without further purification. C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrFNO<sub>2</sub>; MW: 362; MS (ESI): 362, 364 (M+H)<sup>+</sup>.

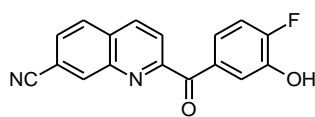
### (7-Bromoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (5.12b).



According to **method 5.F** the title compound was prepared by reaction of the previously obtained (7-bromoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanol (5.12c) with 2-iodoxybenzoic acid (7.20 g, 25.7 mmol, 1.2 eq) overnight. The crude product was washed with methanol to give 5.96 g (16.5 mmol, 77%, two steps) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>BrFNO<sub>2</sub>; MW 360;  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.39-8.38 (m, 1H), 8.33 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.11 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.95 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.87 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.80-7.73 (m, 2H), 7.18 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  191.6, 156.0 (d,  $J$  = 256.1 Hz), 155.4, 147.8 (d,  $J$  = 11.1 Hz), 147.2, 137.4 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 132.7, 132.4 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 132.2, 129.0, 127.6, 126.3 (d,  $J$  = 8.1 Hz), 124.6 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 121.4, 115.8 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 115.8 (d,  $J$  = 19.2 Hz), 56.5; MS (ESI): 360, 362 (M+H)<sup>+</sup>.

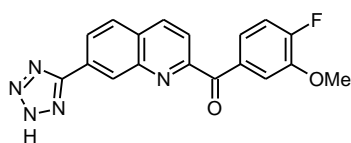
**2-(4-Fluoro-3-methoxybenzoyl)quinoline-7-carbonitrile (5.12a).**

A mixture of (7-bromoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (**5.12b**) (180 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq), zinc cyanide (59 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (17 mg, 0.02 mmol, 0.03 eq) in dimethylformamide (2.5 ml) was degassed and charged with argon. The mixture was stirred for 3 h at 120 °C. The reaction mixture was cooled down to room temperature, diluted with ethyl acetate and washed with water and brine. The organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (neat dichloromethane) to give 105 mg (0.34 mmol, 69%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{11}FN_2O_2$ , MW: 306;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.57-8.56 (m, 1H), 8.42 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 0.6 Hz, 1H), 8.24 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.88 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.82 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.20 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz): 191.2 (d,  $J$  = 1.3 Hz), 156.4, 156.2 (d,  $J$  = 256.7 Hz), 148.0 (d,  $J$  = 11.1 Hz), 145.6, 137.5, 136.3, 132.1 (d,  $J$  = 3.7 Hz), 130.9, 129.4, 129.2, 126.4 (d,  $J$  = 8.2 Hz), 123.6, 118.2, 115.9 (d,  $J$  = 18.9 Hz), 115.7 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 114.1, 56.5; MS (ESI): 307 ( $M+H$ ) $^+$ .

**2-(4-Fluoro-3-hydroxybenzoyl)quinoline-7-carbonitrile (5.12).**

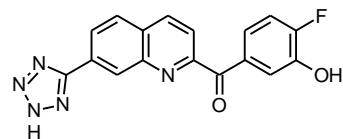
According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of 2-(4-fluoro-3-methoxybenzoyl)quinoline-7-carbonitrile (**5.12a**) (92 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.5 ml, 1.5 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 2:1  $\rightarrow$  1:1) and preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 70:30:0.1  $\rightarrow$  10:90:0.1 in 120 min) to give 53 mg (0.18 mmol, 60%) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_9FN_2O_2$ ; MW: 292; mp: 222-223 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  9.09 (bs, 1H), 8.71 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 8.63 (dd,  $J$  = 1.5 Hz, 0.7 Hz, 1H), 8.31 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.21 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 8.01-7.97 (m, 2H), 7.81 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.29 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta$  191.8, 157.5, 155.8 (d,  $J$  = 250.2 Hz), 146.2, 145.6 (d,  $J$  = 13.5 Hz), 138.7, 136.6, 133.5 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 131.8, 130.7, 129.9, 125.2 (d,  $J$  = 7.8 Hz), 123.9, 121.5 (d,  $J$  = 4.7 Hz), 118.8, 116.8 (d,  $J$  = 19.3 Hz), 114.6; IR: 3066, 3035, 2236, 1674, 1323, 864  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 293 ( $M+H$ ) $^+$ ; **Elemental analysis** calculated (%) for  $C_{17}H_9FN_2O_2 \cdot 0.8 H_2O$ : C 66.58, H 3.48, N 9.13. Found: C 66.44, H 3.27, N 9.15; **HPLC** analysis: retention time = 11.82 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)(7-(tetrazol-5-yl)quinolin-2-yl)methanone (5.13a).**

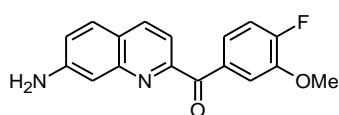


A mixture of 2-(4-fluoro-3-methoxybenzoyl)quinoline-7-carbonitrile (**5.12a**) (306 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq), sodium azide (780 mg, 12.0 mmol, 12.0 eq) and ammonium chloride (642 mg, 12.0 mmol, 12.0 eq) in dimethylformamide (10.0 ml) was exposed to microwave irradiation (30 W, 120 °C, open vessel) for 30 min. The reaction mixture was diluted with water, acidified to pH 1 with 1 M hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (dichloromethane/ methanol/ acetic acid 95:5:1→90:10:1) to give 158 mg (0.45 mmol, 45%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{12}FN_5O_2$ ; MW: 349;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  8.80-8.79 (m, 1H), 8.73 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 0.6 Hz, 1H), 8.39 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 1.7 Hz, 1H), 8.35 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.97-7.93 (m, 2H), 7.80 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J$  = 11.2 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta$  191.4, 155.3, 155.2, 154.8 (d,  $J$  = 253.4 Hz), 147.1 (d,  $J$  = 10.9 Hz), 145.7, 138.0, 132.5 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 129.7 (d,  $J$  = 6.7 Hz), 128.3, 126.3, 126.1, 125.6 (d,  $J$  = 8.3 Hz), 121.9, 115.9, 115.7, 155.6 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 56.1; MS (ESI): 350 ( $M+H^+$ ).

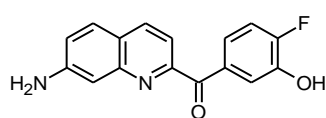
**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[7-(tetrazol-5-yl)quinolin-2-yl]methanone (5.13).**



According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)(7-(tetrazol-5-yl)quinolin-2-yl)-methanone (**5.13a**) (105 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.5 ml, 1.5 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (chloroform/methanol 10:1, 3% acetic acid) and preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 80:20:0.1→35:65:0.1 in 120 min) to give 39 mg (0.12 mmol, 39%) of the title compound containing 0.3 eq trifluoroacetic acid.  $C_{17}H_{10}FN_5O_2$ ; MW: 335; mp: 259-261 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz),  $\delta$  10.35 (bs, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.70 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.39 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 1.3 Hz, 1H), 8.32 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 8.11 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.81 (dd,  $J$  = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.65 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.35 (dd,  $J$  = 11.0 Hz, 8.5 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz),  $\delta$  191.6, 155.6, 155.5, 154.4 (d,  $J$  = 251.1 Hz), 145.7, 144.9 (d,  $J$  = 12.5 Hz), 137.8, 132.3 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 129.6, 129.5, 128.0, 126.6, 126.3, 123.5 (d,  $J$  = 8.1 Hz), 121.7, 120.1 (d,  $J$  = 5.0 Hz), 116.2 (d,  $J$  = 19.1 Hz); IR: 3100, 2711, 1646, 1573, 1320, 1285, 752  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 336 ( $M+H^+$ ); **Elemental analysis** calculated (%) for  $C_{17}H_{10}FN_5O_2 \cdot 0.3 TFA \cdot H_2O$ : C 54.55, H 3.20, N 18.17. Found: C 54.48, H 3.30, N 18.70; **HPLC** analysis: retention time = 8.60 min; peak area, 99.9%, HPLC-method A.

**(7-Aminoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (5.14a).**

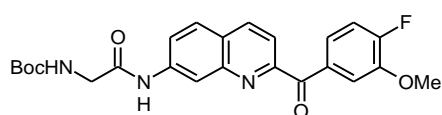
A mixture of (7-bromoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-methanone (**5.12b**) (180 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq), L-proline (23 mg, 0.20 mmol, 0.4 eq), potassium carbonate (207 mg, 1.50 mmol, 3.0 eq) in DMSO (3.0 ml) was degassed and charged with argon. Copper(I) iodide (19 mg, 0.10 mmol, 0.2 eq) was added and the mixture was stirred for 10 min at room temperature. 25% aqueous ammonia (0.1 ml, 1.50 mmol, 3 eq) was added and the reaction mixture was stirred for 15 h at 85 °C. The reaction mixture was cooled down to room temperature and diluted with dichloromethane and saturated ammonium chloride. The aqueous layers were extracted with dichloromethane, the combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1→1:1) to give 48 mg (0.16 mmol, 32%) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_{13}FN_2O_2$ ; MW: 296;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  8.26 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.96 (dd,  $J$  = 8.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.77-7.71 (m, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.63 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.39 (dd,  $J$  = 11.2 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.00 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 5.95 (bs, 2H), 3.92 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  191.9, 154.6 (d,  $J$  = 252.9 Hz), 154.0, 151.1, 148.6, 146.9 (d,  $J$  = 11.0 Hz), 136.8, 133.0 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 128.5, 125.4 (d,  $J$  = 8.2 Hz), 121.4, 121.1, 115.7 (d,  $J$  = 9.0 Hz), 115.6 (d,  $J$  = 21.8 Hz), 106.5, 56.1; MS (ESI): 297 (M+H) $^+$ .

**(7-Aminoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-hydroxyphenyl)methanone (5.14).**

According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of (7-aminoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**5.14a**) (75 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (1.25 ml, 1.25 mmol, 5.0 eq) in dichloromethane (5.0 ml). The crude product was purified by preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 90:10:0.1→10:90:0.1 in 160 min) to give 39 mg (0.14 mmol, 55%) of the title compound containing 0.5 eq trifluoroacetic acid.  $C_{16}H_{11}FN_2O_2$ ; MW: 282; mp: 131-132 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  10.23 (bs, 1H), 8.24 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 0.6 Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.73 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.59 (ddd,  $J$  = 8.5 Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.56 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J$  = 11.0 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.01-7.00 (m, 1H), 5.94 (bs, 2H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta$  192.3, 154.3, 154.1 (d,  $J$  = 250.1 Hz), 150.9, 148.5, 144.6 (d,  $J$  = 12.3 Hz), 136.6, 132.8 (d,  $J$  = 3.3 Hz), 128.5, 123.2 (d,  $J$  = 7.8 Hz), 121.2, 120.8, 120.2 (d,  $J$  = 4.7 Hz), 115.9 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 115.4, 106.4; IR: 3409, 3328, 3217, 1651, 1614, 1439, 1320, 845  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 283 (M+H) $^+$ ; **Elemental analysis** calculated (%) for  $C_{16}H_{11}FN_2O_2 \cdot 0.5 TFA \cdot 1.6 H_2O$ : C 52.34, H 3.54, N 7.18. Found: C 52.38, H 3.60, N 7.15; **HPLC** analysis: retention time = 10.39 min; peak area, 95.9%, HPLC-method B.

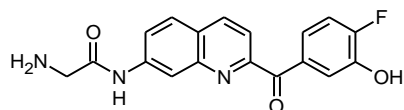


***tert*-Butyl-(2-((2-(4-fluoro-3-methoxybenzoyl)quinolin-7-yl)amino)-2-oxoethyl)carbamate (5.15a).**

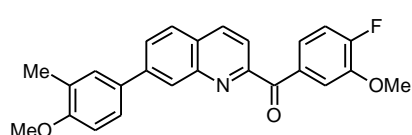


A solution of (7-aminoquinolin-2-yl)(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**5.14a**) (296 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq), Boc-Gly-OH (386 mg, 2.2 mmol, 2.2 eq), HOBt (284 mg, 2.1 mmol, 2.1 eq), EDC·HCl (403 mg, 2.1 mmol, 2.1 eq) and DIPEA (0.84 ml, 4.8 mmol, 4.8 eq) in dichloromethane (20 ml) was stirred at 40 °C overnight. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was taken up in ethyl acetate. The organic layers were washed with 0.5 M hydrochloric acid, saturated sodium bicarbonate and brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:2  $\rightarrow$  1:1) to give 278 mg (0.61 mmol, 61%) of the analytically pure compound. C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>; MW: 453; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  10.38 (bs, 1H), 8.52-8.50 (m, 2H), 8.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.82 (dd, *J* = 8.9 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.77 (ddd, *J* = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 11.2 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.11 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.82 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz):  $\delta$  191.5, 169.0, 156.0, 154.7 (d, *J* = 253.3 Hz), 154.5, 147.0 (d, *J* = 11.0 Hz), 146.8, 140.6, 137.2, 132.7 (d, *J* = 3.6 Hz), 128.5, 125.4 (d, *J* = 8.2 Hz), 125.0, 122.2, 119.0, 116.2, 115.8, 115.6, 78.1, 56.1, 44.0, 28.2; MS (ESI): 454 (M+H)<sup>+</sup>.

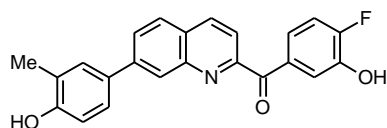
**2-Amino-*N*-[2-(4-fluoro-3-hydroxybenzoyl)quinolin-7-yl]acetamide trifluoroacetate salt (5.15).**



According to **method 5.B1** *tert*-butyl-(2-((2-(4-fluoro-3-methoxybenzoyl)quinolin-7-yl)amino)-2-oxoethyl)carbamate (**5.15a**) (153 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq) was treated with boron tribromide (3.4 ml, 3.4 mmol, 10.0 eq) in dichloromethane (7.0 ml). The residue was taken up in a mixture of dichloromethane and trifluoroacetic acid (1:1, 4.0 ml) and stirred for 1 h at room temperature. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (gradient water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 90:10:0.1  $\rightarrow$  45:55:0.1 in 120 min) to give 47 mg (0.08 mmol, 24%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>; MW: 567; **mp**: 135-136 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  10.93 (bs, 1H), 10.34 (bs, 1H), 8.55 (dd, *J* = 8.6 Hz, 0.7 Hz, 1H), 8.22 (bs, 3H), 8.11 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.78 (dd, *J* = 8.9 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 8.5 Hz, 4.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 11.0 Hz, 8.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz):  $\delta$  191.9, 165.6, 155.2, 154.4 (d, *J* = 250.8 Hz), 146.7, 144.9 (d, *J* = 12.4 Hz), 139.8, 137.3, 132.4 (d, *J* = 3.3 Hz), 128.9, 125.2, 123.4 (d, *J* = 8.0 Hz), 121.9, 120.0 (d, *J* = 5.0 Hz), 119.4, 116.6, 116.1 (d, *J* = 19.0 Hz), 41.3; **IR**: 3082, 1678, 1593, 1436, 1202, 1140 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 340 (M+H)<sup>+</sup>; **Elemental analysis** calculated (%) for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>·1.7 TFA·1.9 H<sub>2</sub>O: C 45.30, H 3.46, N 7.41. Found: C 45.25, H 3.49, N 7.55; **HPLC** analysis: retention time = 11.00 min; peak area, 99.3%, HPLC-method B.

**(4-Fluoro-3-methoxyphenyl)[7-(4-methoxy-3-methylphenyl)quinolin-2-yl]methanone (5.16a).**

A mixture of (7-bromoquinolin-2-yl)-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)methanone (**5.12b**) (180 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq), 4-methoxy-3-methylphenylboronic acid (100 mg, 0.6 mmol, 1.2 eq), cesium carbonate (650 mg, 2.0 mmol, 4.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (12 mg, 2 mol%, 0.02 eq) was solved in DME/water (2:1, 6 ml), degassed and charged with argon. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The reaction mixture was cooled down to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1  $\rightarrow$  5:1  $\rightarrow$  3:1) to give 155 mg (0.39 mmol, 77%) of the analytically pure compound.  $C_{25}H_{20}FNO_3$ ; MW: 401;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.36 (s, 1H), 8.35 (dd,  $J$  = 8.9 Hz, 0.6 Hz, 1H), 8.06 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.96 (dd,  $J$  = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.95-7.92 (m, 2H), 7.90 (ddd,  $J$  = 8.4 Hz, 4.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.61-7.55 (m, 2H), 7.19 (dd,  $J$  = 10.7 Hz, 8.4 Hz, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 2.32 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  192.2, 158.3, 155.9 (d,  $J$  = 255.7 Hz), 154.9, 147.8 (d,  $J$  = 11.1 Hz), 147.1, 143.1, 137.2, 132.7 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 131.7, 129.9, 128.3, 128.1, 127.7, 127.5, 126.9, 126.3 (d,  $J$  = 8.0 Hz), 126.0, 120.6, 115.9 (d,  $J$  = 3.6 Hz), 115.8 (d,  $J$  = 18.9 Hz), 110.5, 56.5, 55.6, 16.6; MS (ESI): 402 ( $M+H^+$ ).

**(4-Fluoro-3-hydroxyphenyl)[7-(4-hydroxy-3-methylphenyl)quinolin-2-yl]methanone (5.16).**

According to **method 5.B1** the title compound was prepared by reaction of (4-fluoro-3-methoxyphenyl)[7-(4-methoxy-3-methylphenyl)quinolin-2-yl]methanone (**5.16a**) (120 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq) with boron tribromide (3.0 ml, 3.0 mmol, 10.0 eq) in dichloromethane (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 3:1) to give 89 mg (0.24 mmol, 80%) of the analytically pure compound.  $C_{23}H_{16}FNO_3$ ; MW: 373; mp: 199-200 °C;  $^1H$  NMR (acetone- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9.05 (bs, 1H), 8.53 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 0.7 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.30-8.26 (m, 1H), 8.10 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 8.06-7.97 (m, 3H), 7.84 (ddd,  $J$  = 8.6 Hz, 4.6 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J$  = 2.3 Hz, 0.7 Hz, 1H), 7.56 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.5 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.29 (dd,  $J$  = 10.8 Hz, 8.5 Hz, 1H), 7.00 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  192.4 (d,  $J$  = 1.0 Hz), 156.9, 156.1, 155.5 (d,  $J$  = 249.6 Hz), 148.0, 145.5 (d,  $J$  = 13.2 Hz), 143.8, 137.9, 134.1 (d,  $J$  = 5.8 Hz), 131.6, 130.7, 129.1, 128.6, 128.4, 126.9, 126.7, 126.0, 125.1 (d,  $J$  = 7.7 Hz), 121.6 (d,  $J$  = 4.4 Hz), 120.8, 116.6 (d,  $J$  = 19.1 Hz), 116.2, 16.3; IR: 3401, 2925, 2585, 1664, 1620, 1604, 1592, 1501, 1110, 768, 748  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 374 ( $M+H^+$ ); HPLC analysis: retention time = 13.62 min; peak area, 98.8%, HPLC-method A.



### 5.12.2 Biological methods

#### Inhibition of 17 $\beta$ -HSD14

Inhibitory activities were evaluated with a fluorimetric assay as previously described in chapter 3 (Kapitel 3).

#### P-gp ATPase Activity Assays

The effect of inhibitors **3.8**, **5.12**, **5.13** and **5.15** on P-gp ATPase activity was evaluated by means of the P-gp-assay system (Promega, Madison, WI, USA).<sup>30</sup> In a white 96-well plate, the inhibitors **3.8**, **5.12**, **5.13** and **5.15** in DMSO (final concentration in assay: 10  $\mu$ M) were incubated with 25  $\mu$ g of recombinant human P-gp membrane. The P-gp-glo assay buffer was used as the untreated sample control. The positive control of drug induced P-gp ATPase activity was obtained by addition of 200  $\mu$ M verapamil in the assay buffer. As selective inhibitor of P-gp ATPase activity, 100  $\mu$ M sodium orthovanadate in the assay buffer was used. All the samples contained a final DMSO concentration of 1%. The P-gp ATPase activity was initiated by the addition of 5 mM MgATP and incubated at 37 °C for 60 min and luminescence by adding 50  $\mu$ L of ATP detection reagent. After 25 min of incubation at room temperature, the total luminescence signal was detected on a Tecan Saphire 2.

## 5.13 Appendix

### 5.13.1 Physicochemical properties

**Table 5.5:** Physicochemical properties table of the inhibitors.

Verb.	MW <sup>a</sup>	clog <i>P</i> <sup>a</sup>	rotatable bonds <sup>a</sup>	H-bond donor <sup>a</sup>	H-bond acceptor <sup>a</sup>	tPSA <sup>a</sup>	Solubility <sup>b</sup>
<b>3.8</b>	327.28	2.98	3	2	4	70.42	> 200 $\mu$ M
<b>5.1</b>	315.27	3.32	3	2	4	62.58	> 200 $\mu$ M
<b>5.2</b>	314.29	3.49	3	3	4	65.38	> 200 $\mu$ M
<b>5.3</b>	328.31	3.73	3	2	4	56.59	> 200 $\mu$ M
<b>5.4</b>	325.31	4.06	3	2	3	53.35	> 200 $\mu$ M
<b>5.8</b>	267.25	3.08	2	1	3	50.19	100-200 $\mu$ M
<b>5.9</b>	266.27	4.45	2	1	2	37.30	25-50 $\mu$ M
<b>5.10</b>	281.28	3.43	2	1	3	50.19	25-50 $\mu$ M
<b>5.11</b>	283.25	2.59	2	2	4	70.42	> 200 $\mu$ M
<b>5.12</b>	292.26	2.86	3	1	4	73.98	25-50 $\mu$ M
<b>5.13</b>	282.27	2.24	2	3	4	76.21	100-200 $\mu$ M
<b>5.14</b>	339.32	1.03	4	4	6	105.31	> 200 $\mu$ M
<b>5.15</b>	335.29	2.22	3	2	7	104.65	> 200 $\mu$ M
<b>5.16</b>	373.38	4.29	3	2	4	70.42	12.5-25 $\mu$ M

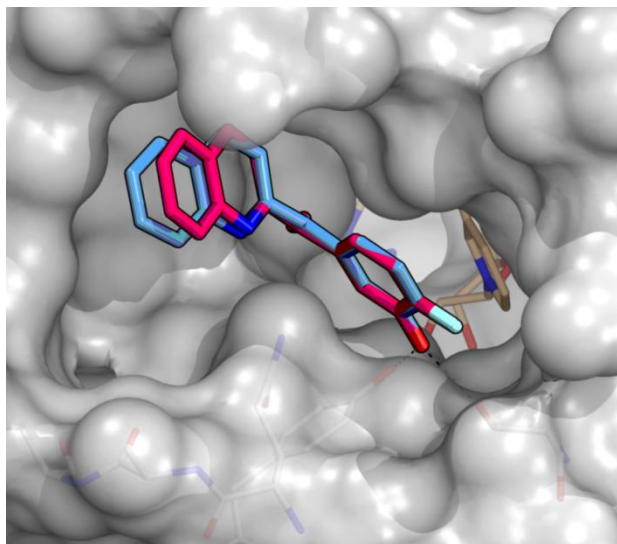
<sup>a</sup>calculated with ACD/Percepta 14.0.0

<sup>b</sup>Solubility tested in Phosphate-Buffered Saline (PBS, pH 7.4) at various inhibitor concentrations (3.13-200  $\mu$ M, final DMSO concentration 2%). Clarity of the solutions was evaluated optically.

### 5.13.2 MOE models

#### MOE model of compound 3.8

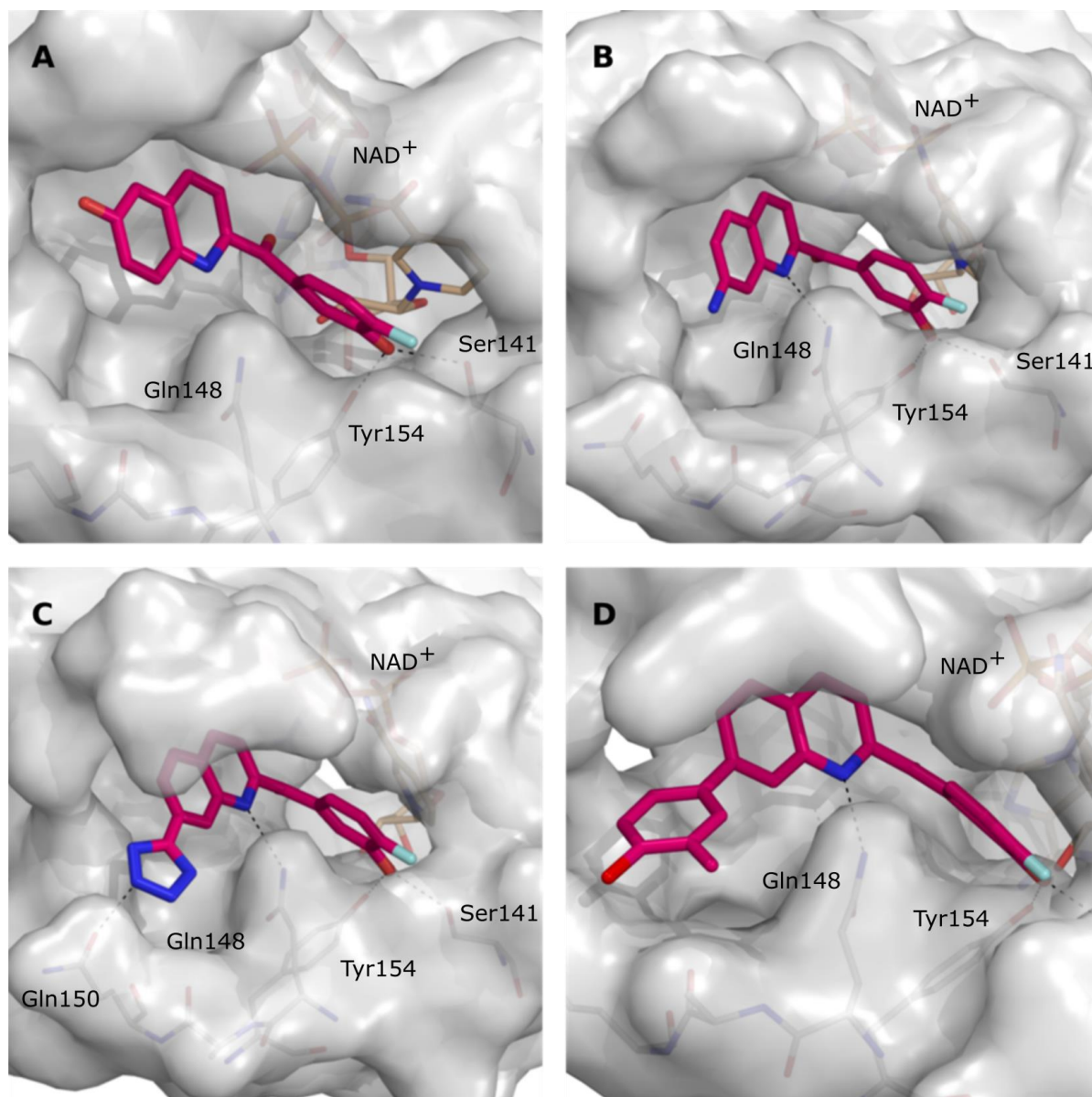
The inhibitor 3.8 was model inside the crystal structure PDB ID: 5L7Y<sup>31</sup> and minimized with MOE.<sup>32</sup> During the minimization, the heavy atoms of the protein and of the C-ring of the ligands were fixed.



**Figure 5.9:** Superimposition of the modeled structure of h17 $\beta$ -HSD14 in complex with inhibitor 3.8 and of its crystal structure (PDB ID: 5O6Z). The protein is displayed in gray based on the solvent accessible surface. The ligands are shown as stick models. The C atoms of the modeled ligand are colored in red and blue for the crystallized compounds. Amino acids and cofactor are shown as thin bonds. H-bonds are depicted as black dotted lines.

**MOE models of compounds 5.11, 5.14, 5.13 and 5.16**

The inhibitors **5.11**, **5.14**, **5.13** and **5.16** were model inside the crystal structure of **3.8** in complex with the protein PDB ID: 5L7Y<sup>31</sup> and minimized with MOE.<sup>32</sup> During the minimization, the 3-OH group at the C-ring of the inhibitors was fixed.



**Figure 5.10:** Modeled structures of h17 $\beta$ -HSD14 in complex with inhibitors **5.11** (A), **5.14** (B), **5.13** (C) and **5.16** (D). The protein is displayed in gray by use of the solvent accessible surface. The inhibitors are shown as stick models. The C atoms of the modeled ligand are colored in pink. Amino acids and cofactor are shown as thin lines. H-bonds are depicted as black dotted lines.

## 5.13.3 Crystallographic tables

**Table 5.6.** Data collection and refinement statistic for the crystal structures.

PDB ID code <sup>a</sup>	Complex with <b>5.1</b> , 5O6O	Complex with <b>5.3</b> , 5O43	Complex with <b>5.4</b> , 5O42
<b>(A) Data collection and processing</b>			
space group	<i>I</i> 422	<i>I</i> 422	<i>I</i> 422
unit cell parameters <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	91.4, 91.4, 133.3	91.6, 91.6, 133.1	91.5, 91.5, 133.1
Matthews coefficient <sup>b</sup> (Å <sup>3</sup> /Da)	2.4	2.4	2.4
solvent content <sup>b</sup> (%)	49.4	49.5	49.4
<b>(B) Diffraction data</b>			
resolution range (Å)	50-1.45 (1.54–1.45)	50-1.50 (1.59-1.50)	50-1.76 (1.86-176)
unique reflections	50086 (7930)	45487 (7233)	28404(4435)
<i>R</i> ( <i>I</i> ) <sub>sym</sub> (%)	7.3 (49.2)	9.0 (50.4)	9.8 (52.0)
Wilson <i>B</i> factor (Å <sup>2</sup> )	12.6	13.9	18.1
completeness (%)	99.8 (99.3)	99.9 (100.0)	99.6 (98.1)
redundancy	8.6 (8.2)	8.6 (8.8)	7.9 (8.1)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	18.1 (3.9)	13.7 (3.3)	15.3 (3.4)
<b>(C) Refinement</b>			
resolution range (Å)	45.69-1.45	46.41-1.50	46.38-1.76
reflections used in refinement (work/free)	50086(47581/2505)	45487 (43212/2275)	28404 (26983/1421)
final <i>R</i> value for all reflections (work/free) (%)	0.15/0.17	0.15/0.17	0.15/0.19
protein residues	256	253	256
water molecules	206	220	208
RMSD from ideality: bond lengths (Å)	0.008	0.007	0.008
RMSD from ideality: bond angles (°)	1.039	0.981	0.986
<i>Ramachandran plot:</i> <sup>c</sup>			
residues in most favored regions (%)	91.8	91.3	91.3
residues in additionally allowed regions (%)	8.2	8.7	8.2
residues in generously allowed regions (%)	0	0	0.5
residues in disallowed regions (%)	0	0	0
Mean <i>B</i> factor protein (Å <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	17.7	18.2	21.6
Mean <i>B</i> factor ligand (Å <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	25.0	23.1	20.5
Mean <i>B</i> factor water molecules (Å <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	28.2	30.7	32.0

<sup>a</sup> Values in parenthesis describe the highest resolution shell. <sup>b</sup> Calculated with Matthews\_coef program from CCP4 suite version 6.4.0.<sup>33</sup> <sup>c</sup> Calculated with PROCHECK.<sup>34</sup> <sup>d</sup> Mean *B* factors were calculated with MOLEMAN.<sup>35</sup>

PDB ID code <sup>a</sup>	Complex with <a href="#">5.8</a> , 5O6Z	Complex with <a href="#">5.12</a> , 5O7C	Complex with <a href="#">5.15</a> , 5O72	Complex with <a href="#">5.10</a> , 5O6X
<b>(A) Data collection and processing</b>				
space group	<i>I</i> 422	<i>I</i> 422	<i>I</i> 422	<i>I</i> 422
unit cell parameters <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	91.3, 91.3, 132.6	91.2, 91.2, 131.8	92.2, 92.2, 133.2	91.1, 91.1, 133.4
Matthews coefficient <sup>b</sup> (Å <sup>3</sup> /Da)	2.4	2.4	2.5	2.4
solvent content <sup>b</sup> (%)	49.0	48.7	50.2	49.1
<b>(B) Diffraction data</b>				
resolution range (Å)	50-1.57 (1.67-1.57)	50-1.60 (1.70-1.60)	50-1.91 (2.03-1.91)	50-1.35 (1.43-1.35)
unique reflections	39289 (6231)	36906 (5872)	22541 (3581)	117838 (19085)
<i>R</i> ( <i>I</i> ) <sub>sym</sub> (%)	5.1 (50.6)	7.5 (47.5)	8.3 (4.3)	5.9 (51.9)
Wilson <i>B</i> factor (Å <sup>2</sup> )	16.4	15.3	22.3	11.8
completeness (%)	99.8 (99.9)	99.5 (99.8)	99.7 (99.7)	99.9 (99.9)
redundancy	8.6 (8.6)	8.5 (8.2)	8.3 (8.6)	6.8 (6.6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	26.5 (4.1)	17.4 (3.5)	18.1 (4.0)	19.1 (3.7)
<b>(C) Refinement</b>				
resolution range (Å)	45.7-1.57	46.1-1.60	46.6-1.91	46.4-1.35
reflections used in refinement (work/free)	39289 (37324/1965)	36906 (35060/1846)	22541 (21414/1127)	117838 (111952/5886)
final <i>R</i> value for all reflections (work/free) (%)	0.14/0.16	0.16/0.19	0.17/0.21	0.12/0.14
protein residues	257	257	255	253
water molecules	222	218	203	246
RMSD from ideality: bond lengths (Å)	0.008	0.008	0.010	0.006
RMSD from ideality: bond angles (°)	0.996	0.993	1.045	0.947
<i>Ramachandran plot:</i> <sup>c</sup>				
residues in most favored regions (%)	91.4	91.4	91.3	91.7
residues in additionally allowed regions (%)	8.1	8.1	8.2	7.8
residues in generously allowed regions (%)	0.5	0.5	0.5	0.5
residues in disallowed regions (%)	0	0	0	0
Mean <i>B</i> factor protein (Å <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	19.0	19.7	23.8	14.1
Mean <i>B</i> factor ligand (Å <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	27.6	31.7	35.7	18.5
Mean <i>B</i> factor water molecules (Å <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	30.7	30.7	31.7	27.8

<sup>a</sup> Values in parenthesis describe the highest resolution shell. <sup>b</sup> Calculated with Matthews\_coef program from CCP4 suite version 6.4.0. <sup>33</sup> <sup>c</sup> Calculated with PROCHECK. <sup>34</sup> <sup>d</sup> Mean B factors were calculated with MOLEMAN. <sup>35</sup>

## 5.14 Referenzen

- (1) Callaghan, R.; Luk, F.; Bebawy, M. Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy? *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2014**, *42*, 623–631.
- (2) Graham L Patrick; Mourik, T. van. *An Introduction to Medicinal Chemistry 5th Edition*.
- (3) *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.x Schrödinger, LLC*.
- (4) Baell, J. B.; Holloway, G. A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740.
- (5) [http://cbligand.org/PAINS/search\\_struct.php](http://cbligand.org/PAINS/search_struct.php), 15.11.2016.
- (6) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.
- (7) Wittig, G.; Geissler, G. Zur Reaktionsweise Des Pentaphenyl-Phosphors Und Einiger Derivate. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *580*, 44–57.
- (8) Wengryniuk, S. E.; Weickgenannt, A.; Reiher, C.; Strotman, N. A.; Chen, K.; Eastgate, M. D.; Baran, P. S. Regioselective Bromination of Fused Heterocyclic N-Oxides. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 792–795.
- (9) Petit, M.; Bort, G.; Doan, B.-T.; Sicard, C.; Ogden, D.; Scherman, D.; Ferroud, C.; Dalko, P. I. X-Ray Photolysis To Release Ligands from Caged Reagents by an Intramolecular Antenna Sensitive to Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9708–9711.
- (10) Doebner, O.; v. Miller, W. Ueber Eine Dem Chinolin Homologe Base. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 2812–2817.
- (11) Alterman, M.; Hallberg, A. Fast Microwave-Assisted Preparation of Aryl and Vinyl Nitriles and the Corresponding Tetrazoles from Organo-Halides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7984–7989.
- (12) Zeng, X.; Huang, W.; Qiu, Y.; Jiang, S. An Efficient Copper-Catalyzed Synthesis of Anilines by Employing Aqueous Ammonia. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8224–8227.
- (13) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- (14) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- (15) Lukacik, P.; Keller, B.; Bunkoczi, G.; Kavanagh, K.; Hwa Lee, W.; Adamski, J.; Oppermann, U. Structural and Biochemical Characterization of Human Orphan DHRS10 Reveals a Novel Cytosolic Enzyme with Steroid Dehydrogenase Activity. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 419–427.
- (16) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRx* **2005**, *2*, 541–553.

- (17) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, 2000.
- (18) Bertoletti, N.; Braun, F.; Lepage, M.; Möller, G.; Adamski, J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. New Insights into Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14: First Crystal Structures in Complex with a Steroidal Ligand and with a Potent Nonsteroidal Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6961–6967.
- (19) Braun, F.; Bertoletti, N.; Möller, G.; Adamski, J.; Steinmetzer, T.; Salah, M.; Abdelsamie, A. S.; van Koppen, C. J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. First Structure–Activity Relationship of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14 Nonsteroidal Inhibitors and Crystal Structures in Complex with the Enzyme. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10719–10737.
- (20) Drabek, M. *Discovering Novel Inhibitor Scaffolds For 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-14 With In Silico Methods*, Philipps-Universität Marburg, 2016.
- (21) Lukacik, P.; Keller, B.; Bunkoczi, G.; Kavanagh, K.; Hwa Lee, W.; Adamski, J.; Oppermann, U. Structural and Biochemical Characterization of Human Orphan DHRS10 Reveals a Novel Cytosolic Enzyme with Steroid Dehydrogenase Activity. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 419–427.
- (22) Kissinger, C. R.; Rejto, P. A.; Pelletier, L. A.; Thomson, J. A.; Showalter, R. E.; Abreo, M. A.; Agree, C. S.; Margosiak, S.; Meng, J. J.; Aust, R. M.; Vanderpool, D.; Li, B.; Tempczyk-Russell, A.; Villafranca, J. E. Crystal Structure of Human ABAD/HSD10 with a Bound Inhibitor: Implications for Design of Alzheimer’s Disease Therapeutics. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 943–952.
- (23) Lustbader, J. W.; Cirilli, M.; Lin, C.; Xu, H. W.; Takuma, K.; Wang, N.; Caspersen, C.; Chen, X.; Pollak, S.; Chaney, M.; Trinchese, F.; Liu, S.; Gunn-Moore, F.; Lue, L.-F.; Walker, D. G.; Kuppusamy, P.; Zewier, Z. L.; Arancio, O.; Stern, D.; Yan, S. S.; Wu, H. ABAD Directly Links Abeta to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer’s Disease. *Science* **2004**, *304*, 448–452.
- (24) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (25) Urquhart, B. L.; Kim, R. B. Blood-Brain Barrier Transporters and Response to CNS-Active Drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65*, 1063–1070.
- (26) Haeseleer, F.; Palczewski, K. Short-Chain Dehydrogenases/Reductases in Retina. *Methods Enzymol.* **2000**, *316*, 372–383.
- (27) Cassetta, A.; Stojan, J.; Krastanova, I.; Kristan, K.; Brunskole Švegelj, M.; Lamba, D.; Rižner, T. L. Structural Basis for Inhibition of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases by Phytoestrogens: The Case of Fungal 17 $\beta$ -HSDcl. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *171*, 80–93.
- (28) Wang, Q.; Rager, J. D.; Weinstein, K.; Kardos, P. S.; Dobson, G. L.; Li, J.; Hidalgo, I. J. Evaluation of the MDR-MDCK Cell Line as a Permeability Screen for the Blood-Brain Barrier. *Int. J. Pharm.* **2005**, *288*, 349–359.



- (29) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, 62 (21), 7512–7515.
- (30) [https://www.promega.de/products/cell-health-assays/adme-assays/pgp\\_glo-assay-systems/?catnum=V3591](https://www.promega.de/products/cell-health-assays/adme-assays/pgp_glo-assay-systems/?catnum=V3591). 05.07.2017
- (31) Bertoletti, N.; Braun, F.; Lepage, M.; Möller, G.; Adamski, J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. New Insights into Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14: First Crystal Structures in Complex with a Steroidal Ligand and with a Potent Nonsteroidal Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 6961–6967.
- (32) Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2016.
- (33) Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, 50, 760–763.
- (34) Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, 26, 283–291.
- (35) Kleywegt, G. J.; Zou, J. Y.; Kjeldgaard, M.; Jones, T. A. *International Tables for Crystallography, Volume F. Crystallography of Biological Macromolecules*; Rossmann, M.G. and Arnold, E., 2001; Vol. Vol. F.



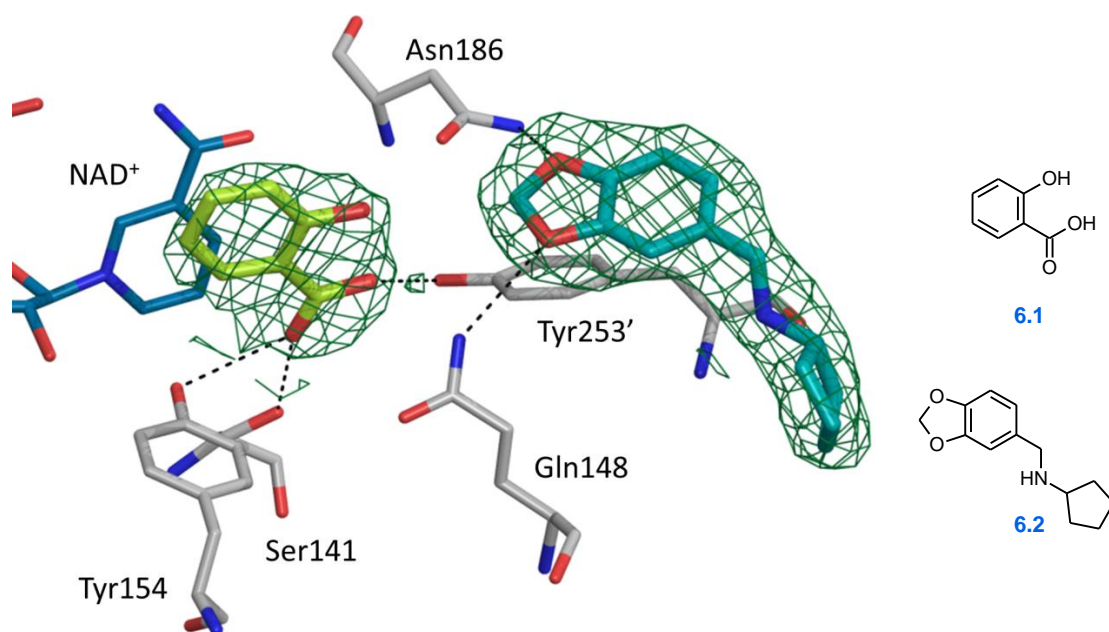
# Fragmentbasierter Entwurf von potentiellen 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren

# 6

## 6.1 Einleitung

Zur Optimierung der Aktivität und Selektivität von Wirkstoffkandidaten sind Fragmente aufgrund ihrer geringen Größe ideale Startstrukturen. Es werden kleine Molekülbausteine herangezogen, welche an ein Protein binden können und damit der Raum möglicher Wechselwirkungen mit einem Protein unter Berücksichtigung der konformativen Vielfalt analysiert. Ein auf die Kristallographie gestütztes *fragment screening* ist ein vielversprechender Ansatz um vor allem bei Fragmenten mit einer schwachen Bindungsaffinität eine größere Anzahl an *hits* bei gleichzeitiger Charakterisierung der Bindungspose zu erhalten, als sie für andere biophysikalische *screening* Methoden zu erwarten wäre.<sup>1</sup>

Ausgehend von einer 96er Strukturbibliothek, die in dem BMBF-Projekt Frag2Xtal entwickelt wurde, konnte von NICOLE BERTOLETTI (AG Klebe, Philipps-Universität Marburg) eine *fragment-based lead discovery* (FBLD) Studie durchgeführt werden. Dabei waren Kristallstrukturen von unterschiedlichen Verbindungen zu erhalten, die eine Bindung der jeweiligen Strukturen in die aktive Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 aufzeigen. Salicylsäure [6.1](#) und das Benzodioxolderivat [6.2](#) konnten bei der Verfeinerung der Kristallstrukturen eindeutig in der Elektronendichte identifiziert werden. Ligand [6.1](#) ist tief in der aktiven Tasche lokalisiert und bildet H-Brückenbindungen über das Carbonsäuremotiv mit Ser141 und Tyr154 der katalytischen Triade aus. Der Ligand [6.2](#) ragt aus der Substratbindetasche heraus, wobei der Benzodioxolring H-Brücken mit Glu148 und Asn186 ausbildet (**Abb. 6.1**).



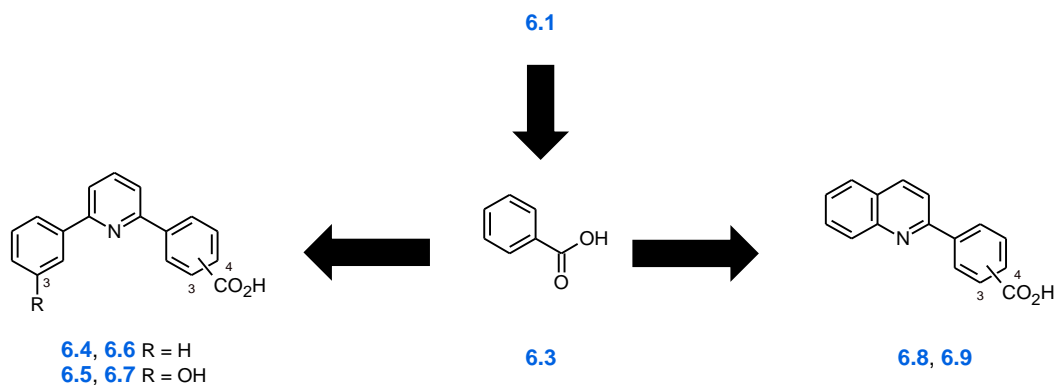
**Abb. 6.1:** Überlagerung der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in ternären Komplexen mit den *screening hits* 6.1 und 6.2. Die Kohlenstoffe sind für 6.1 in hellgrün und 6.2 in türkis veranschaulicht. Sie sind als Stäbchenmodelle und der Cofaktor (blau) mit schmalen Bindungen abgebildet. Die  $F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte für die Inhibitor 6.1 und 6.2 sind in dunkelgrün bei 3 $\sigma$  angegeben. H-Brücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

## 6.2 Design

Ausgehend von Verbindungen **6.1** und **6.2** wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um nach einem fragmentbasierten Entwurf mögliche Kandidaten zur Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren zu identifizieren.

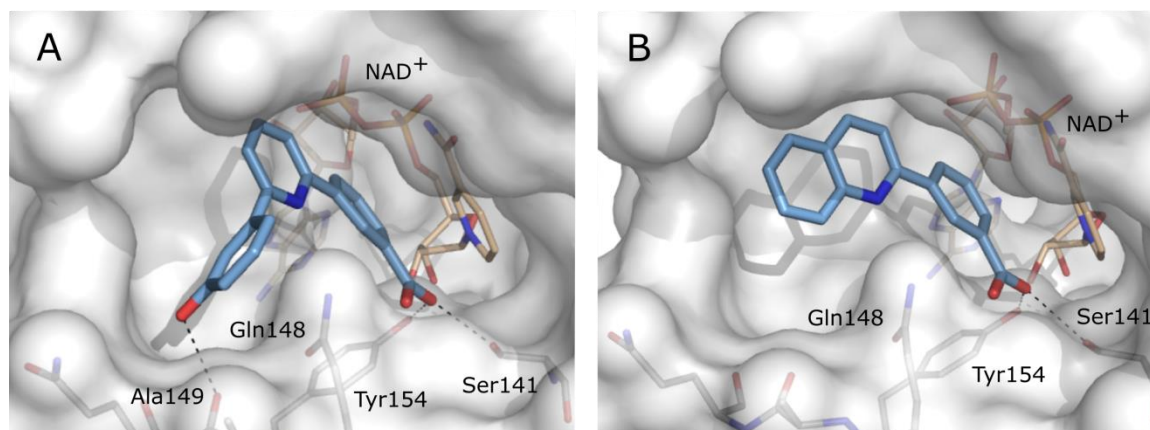
### Erster Ansatz: *Fragment growing*

Im ersten Teil wurde Salicylsäure **6.1** als Ausgangsverbindung gewählt, welche durch einen *fragment-growing* Ansatz weiterentwickelt werden sollte. Hierzu wurde zum einen das 2-Phenylpyridinmotiv aus **Kapitel 3**, sowie das Chinolinmotiv aus **Kapitel 5** aufgegriffen, um welche das Fragment **6.1** erweitert werden sollte. Hierbei wurde auf die Hydroxygruppe der Salicylsäure verzichtet, da zum einen ihre Position nicht zweifelsfrei aus der Elektronendichte ersichtlich war. Zum anderen wäre sie, ausgehend von der vermuteten Position (vgl. **Abb. 6.1**), zu den angestrebten Verknüpfungspartnern hin ausgerichtet gewesen. Somit wurde Benzoesäure **6.3** als eigentliches Fragment für diese Modifikationen gewählt. Der C-Ring der Pyridinverbindungen wurde zum einen frei von Substituenten gehalten oder in 3-Position mit einer Hydroxygruppe versehen um mögliche Interaktionen mit dem Protein zu ermöglichen. Die Erweiterung des Fragments **6.3** erfolgte ausgehend von dessen 3-Position und resultierte für die Pyridinstrukturen in den Verbindungen **6.4** und **6.5**. Analog wurde angestrebt die in 4-Position substituierten Benzoesäurederivate darzustellen (**6.6** und **6.7**). Auf identische Weise erfolgte der Entwurf der Chinoline **6.8** und **6.9** (**Abb. 6.2**).



**Abb. 6.2:** *Fragment growing* Ansatz zur Entwicklung potentieller 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren ausgehend von Salicylsäure **6.1**.

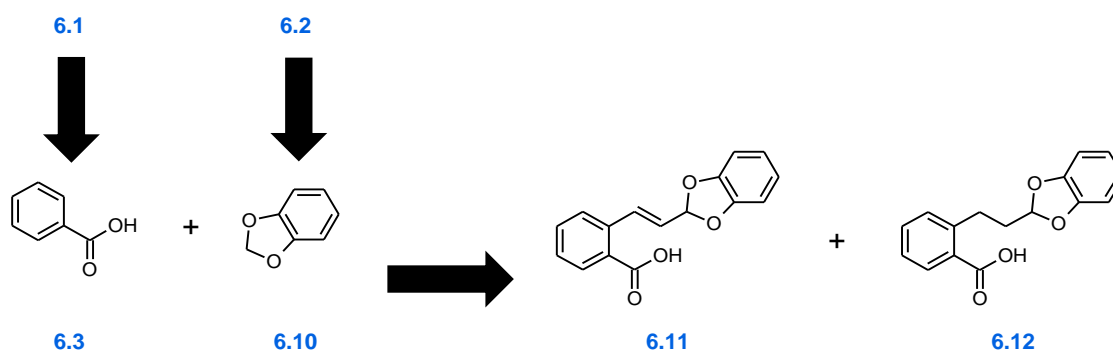
Bevor eine Synthese für die in **Abb. 6.2** dargestellten Verbindungen entwickelt wurde, wurde deren Bindungsmodi in der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 simuliert. Hierzu wurden mit Hilfe von MOE<sup>2</sup> und der erhaltenen Kristallstruktur von Salicylsäure **6.1** im Komplex mit dem Target, modellierte Strukturen angefertigt (**Abb. 6.3**). Ausgehend von den berechneten Bindungsposen für die Verbindungen **6.5** und **6.8** konnte eine Bindung angenommen werden.



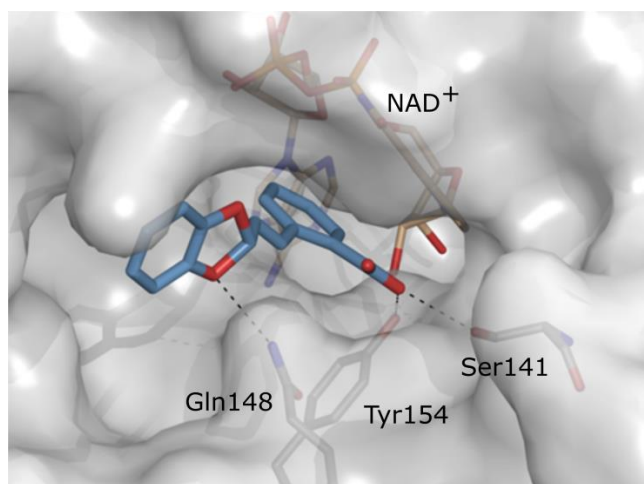
**Abb. 6.3:** Modellerte Strukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit den vorgeschlagenen Verbindungen **6.5** (A) und **6.8** (B). Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) in grau dargestellt. Die Inhibitoren sind als Stäbchenmodelle und ausgewählte Aminosäuren und der Cofaktor (NAD<sup>+</sup>) sind mit schmalen Bindungen abgebildet. Die Kohlenstoffatome der Inhibitoren sind in blau dargestellt. Mögliche H-Brücken sind als gestrichelte Linien veranschaulicht.

### Zweiter Ansatz: *Ligand linking*

Im zweiten Teil wurde eine Verknüpfung (*ligand-linking*) der Fragmente **6.1** und **6.2** angestrebt. Wie im ersten Ansatz, musste auf die Hydroxygruppe der Salicylsäure verzichtet werden um eine Verknüpfung der Fragmente ermöglichen zu können. Zur Vereinfachung dieses Ansatzes wurde ebenfalls der *N*-methylcyclopentanamin-Substituent von Verbindung **6.2** entfernt, für den keine spezifische Interaktionen mit dem Protein festgestellt werden konnten. Somit wurde das Benzodioxol **6.10** als Ausgangsverbindung gewählt, dass mit Benzoesäure **6.3** verknüpft werden sollte. Dabei war es wichtig, dass die ursprünglichen Positionen der Grundgerüste beider „*screening hits*“ **6.1** bzw. **6.2** und die damit verbundenen Interaktionen mit dem Protein beibehalten wurden. Durch eine Modellstudie wurde Verbindung **6.11** als Struktur identifiziert, die dieses Kriterium erfüllen sollte (Abb. **6.5** und **6.6**). Diese zeichnet sich durch eine *E*-konfigurierte Doppelbindung zwischen beiden Ausgangsbausteinen aus. Das Analogon **6.12**, mit einem gesättigten *linker* zwischen den Fragmenten **6.3** und **6.10** sollte im weiteren Verlauf der Untersuchungen ebenfalls dargestellt werden, welches sich im Vergleich zu Verbindung **6.11** nur geringfügig in seiner geometrischen Struktur unterscheiden sollte (Abb. **6.5**).



**Abb. 6.5:** Entwurf der Verbindungen **6.11** und **6.12** durch *ligand-linking* der Fragmente **6.3** und **6.10**.

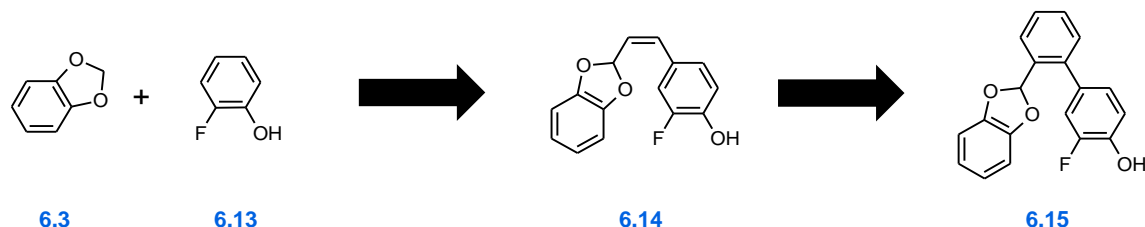


**Abb. 6.6:** Modellierter Struktur von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit der vorgeschlagenen Verbindung **6.11**. Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) in grau dargestellt. Die Inhibitoren sind als Stäbchenmodelle und ausgewählte Aminosäuren und der Cofaktor (NAD<sup>+</sup>) sind mit schmalen Bindungen abgebildet. Die Kohlenstoffatome der Inhibitoren sind in blau dargestellt. Mögliche H-Brücken sind als gestrichelte Linien veranschaulicht.

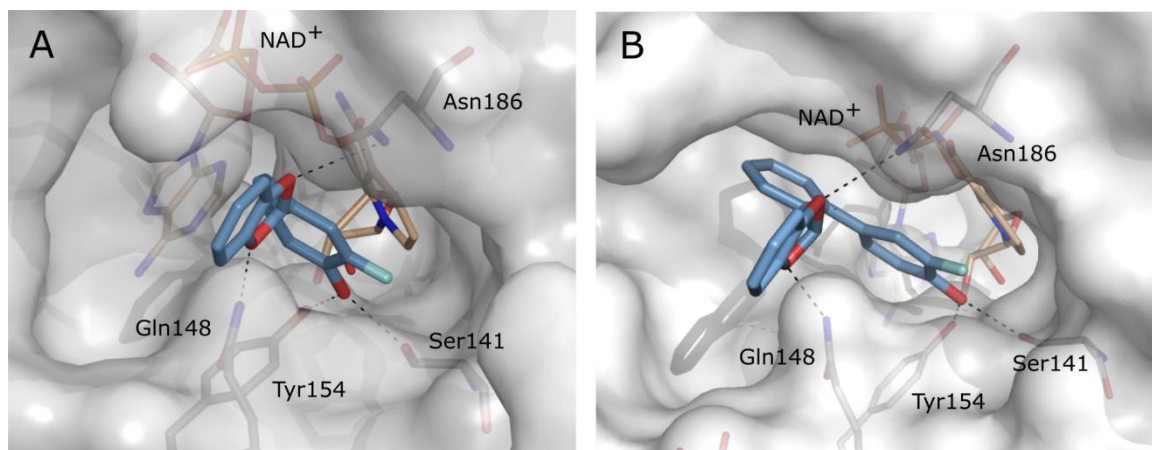
### Dritter Ansatz: *Fragment growing*

Im dritten Teil wurde ebenfalls ausgehend von Benzodioxol **6.10** ein weiterer Verknüpfungsansatz verfolgt. Als Pendant wurde das 3-OH/4-F Phenylmotiv aus **Kapitel 3** als Fragment **6.13** gewählt (**Abb. 6.7**). Dieses sollte eine Bindung über die Hydroxygruppe mit Tyr154 und Ser141 der katalytischen Triade ermöglichen und somit zu einer hohen Affinität der entworfenen Strukturen zum Target beitragen. Als Ausgangspunkt für eine Modellstudie diente der C-Ring aus der Kristallstruktur von Verbindung **3.21** (vgl. **Kapitel 3**, PDB: 5ICM). Wie auch zuvor wurde bei diesem Ansatz angestrebt, die ursprünglichen Positionen beider Teilstrukturen beizubehalten. Dabei konnte zunächst Verbindung **6.14** als mögliche Struktur identifiziert werden, die dieses Kriterium erfüllte (**Abb. 6.8A**). Dieser Inhibitor kandidat zeichnet sich durch eine Z-konfigurierte Doppelbindung zwischen beiden Fragmenten aus. Während der Synthese dieser Verbindung ergaben sich jedoch Probleme (siehe **Abschnitt 7.3**), sodass im Verlauf dieses Ansatzes eine alternative Struktur entworfen wurde. So

resultierte die Weiterentwicklung von **6.14** in Verbindung **6.15** mit einem Phenylring als *linker*, der eine schnelle Synthese dieses potentiellen Inhibitors gewährleisten sollte und ebenfalls die angestrebte „Z-Geometrie“ ermöglicht. Auch für diese, konnte für eine mit MOE modellierte Struktur eine mögliche Bindungspose in der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 bestätigt werden (**Abb. 4B**).



**Abb. 6.7:** Ausgehend von den Fragmenten **6.3** und **6.13** entworfene Verbindungen **6.14** und **6.15**.



**Abb. 6.8:** Modellierte Strukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit den vorgeschlagenen Verbindungen **6.14** (A) und **6.15** (B). Das Protein ist anhand der Solvens-zugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface*) in grau dargestellt. Die Inhibitoren sind als Stäbchenmodelle und ausgewählte Aminosäuren und der Cofaktor (NAD<sup>+</sup>) sind mit schmalen Bindungen abgebildet. Die Kohlenstoffatome der Inhibitoren sind in blau dargestellt. Mögliche H-Brücken sind als gestrichelte Linien veranschaulicht.



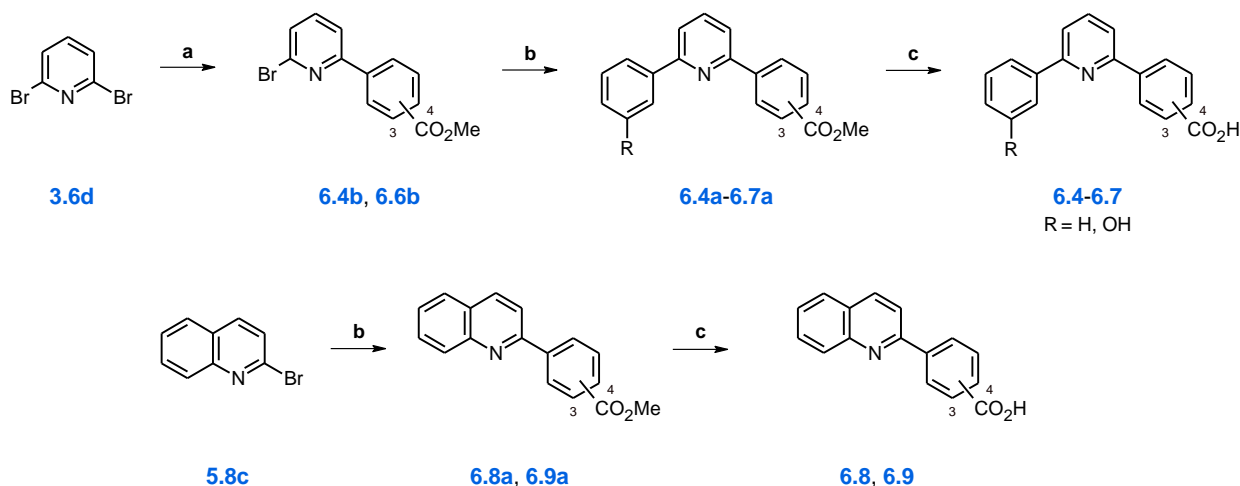
## 6.3 Synthese

### Synthese der Verbindungen 6.4-6.9

Die Synthese der Verbindungen 6.4-6.7 wurde in drei Schritten realisiert. Ein Überschuss an 2,6-Dibrompyridin (3.6d, 4.0 eq) wurde langsam bei 80 °C zur jeweiligen Boronsäure-enthaltenden Reaktionslösung getropft, um die selektiv einfach gekuppelten Produkte 6.4b und 6.6b in einer SUZUKI-MIYAUURA-Reaktion<sup>3</sup> zu erhalten. Durch diese einfache Vorschrift konnten die Zwischenstufen 6.4b und 6.6b in relativ guten Ausbeuten von 54 bzw. 68% erhalten werden. Eine weitere SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung nach Standardbedingungen<sup>4</sup> resultierte in den Verbindungen 6.4a-6.7a, die zu den Endstufen 6.4-6.7 verseift wurden. Dabei konnten über zwei Stufen gute bis sehr gute Ausbeuten (39-78%) ermöglicht werden.

Analog wurden die letzten zwei Schritte durchgeführt um ausgehend von 2-Bromchinolin (5.8c) die Verbindungen 6.8 und 6.9 mit ähnlich guten Ergebnissen zu erhalten (Schema 6.1).

**Schema 6.1:** Synthese der Verbindungen 6.4-6.9.



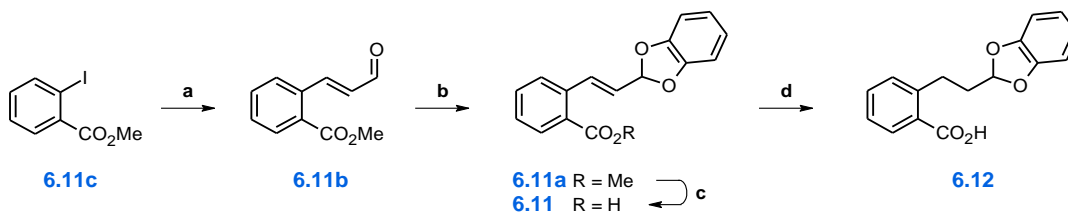
Bedingungen: **a)** 3.6d (4.0 eq), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, R<sub>Ar</sub>B(OH)<sub>2</sub>, DME/H<sub>2</sub>O (2:1); 80 °C, 1 h; **b)** Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, R<sub>Ar</sub>B(OH)<sub>2</sub>, DME/H<sub>2</sub>O (2:1), 80 °C, über Nacht; **c)** LiOH 1 N, MeOH, 40 °C, über Nacht.

### Synthese der Verbindungen 6.11 und 6.12

Die Synthese der Verbindung 6.11 erfolgte in drei Schritten. In einer HECK-Reaktion<sup>5</sup> wurde ausgehend vom 2-Iodobenzoat 6.11c und Acrolein, Verbindung 6.11b dargestellt. In dieser mikrowellenunterstützten Reaktion konnten sehr gute Ausbeuten von bis zu 80% realisiert werden. Die Acetalisierung des Aldehyds mit 1,2-Dihydroxybenzol ergab das Benzodioxolderivat 6.11a in moderater Ausbeute von 34%. Trotz zahlreicher Optimierungsversuche bezüglich des Lösungsmittels, der Menge an Katalysator, der Temperatur und der Reaktionszeit konnten keine besseren Ergebnisse

erzielt werden. Verbindung **6.11a** wurde anschließend nahezu quantitativ zur Endstufe **6.11** verseift. Durch die palladiumkatalysierte Hydrierung der Doppelbindung von Verbindung **6.11a** konnte die Endstufe **6.12** mit ausgezeichnetem Ergebnis (98% Ausbeute) erhalten werden (Schema 6.2).

**Schema 6.2:** Synthese der Verbindungen **6.11** und **6.12**.

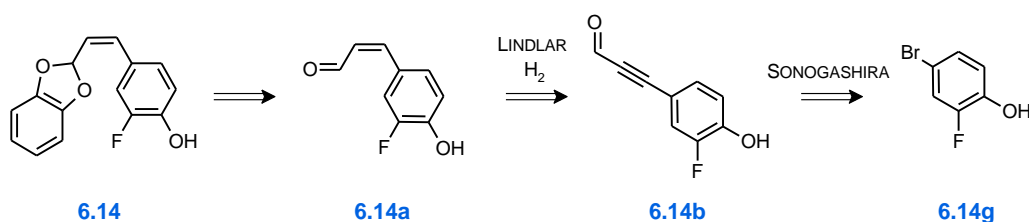


Bedingungen: **a)** Acrolein,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , TBACl,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , (2x 5 mol%),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 2x 1 h,  $\mu\text{W}$ , 150 W, 80 °C, *open vessel*; **b)** 1,2-Dihydroxybenzol,  $\text{MgSO}_4$ , *p*-TsOH (3 mol%), Benzol, DEAN STARK, 110 °C, 2 d; **c)** LiOH 1 N, MeOH, 40 °C, über Nacht; **d)** Pd/C (10 wt. %),  $\text{H}_2$  (1 atm.), EtOAc, 2 h, RT.

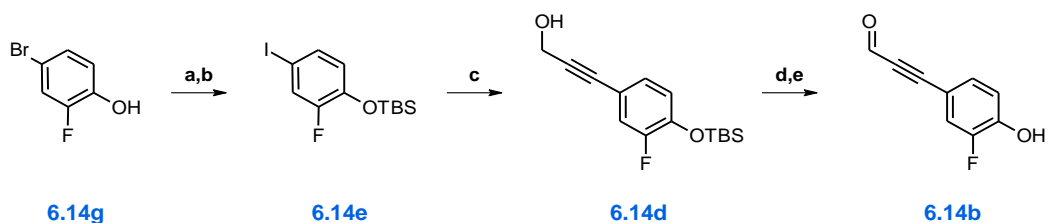
### Synthese der Verbindung **6.14**

In **Schema 6.3** ist die geplante Syntheseroute zur Darstellung von Verbindung **6.14** veranschaulicht. Retrosynthetisch wurde angestrebt im letzten Schritt der Synthese die Zielverbindung **6.14** analog zur bereits vorgestellten Darstellung der Zwischenstufe **6.11a** (**Schema 6.2**) zu erhalten. Hierzu sollte das Carbonyl **6.14a** durch die Z-selektive Hydrierung des Alkins **6.14b** bereitgestellt werden. Ausgehend vom Arylbromid **6.14g** war es das Ziel die Synthese der Vorstufe **6.14b** zu ermöglichen. Hierzu sollte mit einem geeigneten Alkinderivat eine SONOGASHIRA-Kupplung<sup>6</sup> durchgeführt werden.

**Schema 6.3:** Syntheseroute zur Darstellung von Verbindung **6.14**.



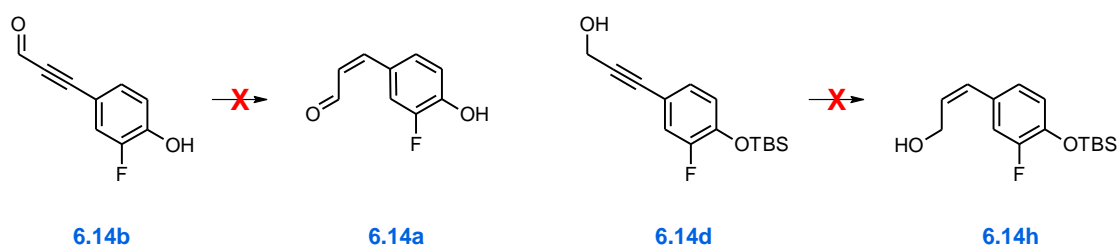
Eine direkte Bildung des Alkins **6.14b** ausgehend vom Arylbromid **6.14g** war jedoch nicht möglich. Eine Umhalogenierung des Bromids mit *n*-BuLi und elementarem Iod war erforderlich, der eine TBS-Schätzung des Alkohols vorangestellt war (**Schema 6.4**). Die Darstellung des geschützten Iodids **6.14e** konnte über zwei Stufen in exzellenter Ausbeute ermöglicht werden. Dieses konnte schließlich zur Bildung des Alkins **6.14d** herangezogen werden, wobei sehr gute Ausbeuten von bis zu 89% resultierten. Die anschließende Oxidation mit IBX und die Entschätzung zum Alkohol **6.14b** mit TBAF erfolgte ebenfalls in sehr guter Ausbeute von 60% über zwei Stufen.

**Schema 6.4:** Syntheseroute zur Darstellung von Verbindung **6.14**.


Bedingungen: **a)** TBSCl, Imidazol, DMF<sub>abs.</sub>, RT, über Nacht; **b)** *n*-BuLi, -80 °C, 30 min, I<sub>2</sub>, -80 °C → RT, 1 h, **c)** Propargylalkohol, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Dioxan<sub>abs.</sub>/Et<sub>3</sub>N 1:1, RT, 1 h; **d)** IBX, 60 °C, 2.5 h; **e)** TBAF, THF, RT, 1 h.

**Probleme bei der Darstellung von Verbindung 6.14a**

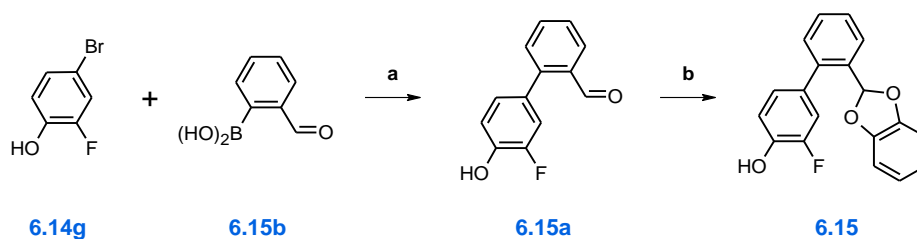
Die zum ersten Mal von LINDLAR beschriebene Methode<sup>7</sup> zur selektiven Hydrierung von Alkinen sollte zur Synthese des *Z*-Alkens **6.14a** führen. Hierzu wurde Verbindung **6.14b** mit kommerziell erhältlichem „LINDLAR-Katalysator“ (Alfa Aesar) unter Wasserstoffatmosphäre (1 atm.) in Ethylacetat umgesetzt. Nach einer Reaktion über Nacht konnte jedoch eine vollständige Hydrierung des Alkins und teilweise des Aldehyds zum Alkohol beobachtet werden (**Schema 6.5**). Um eine erhöhte Selektivität der Reaktion gewährleisten zu können, wurde als weiterer Deaktivator des Katalysators, Chinolin eingesetzt und die Reaktion wurde nach einer Vorschrift von KIM *et al.*<sup>8</sup> in wasserfreiem Methanol durchgeführt. Um auszuschließen, dass die freie Phenolgruppe die Umsetzung beeinflussen könnte, wurde zudem die geschützte Vorstufe **6.14d** als Startpunkt des Hydrierungsschritts gewählt (**Schema 6.5**). Mit diesen Bedingungen konnte nach einer Reaktionszeit von 4 h die Bildung einer Mischung aus Edukt **6.14d** und Produkt **6.14h** (60/40) festgestellt werden. Die Fortsetzung der Reaktion (6 h) resultierte hingegen erneut in einer vollständigen Reduktion zum entsprechenden Alkanderivat. Zahlreiche Ansätze wurden durchgeführt bei denen das Lösungsmittel, die Menge an Katalysator, der Lieferant des Katalysators und die Menge an Chinolin variiert wurden. Dabei konnte das Produkt jedoch gar nicht, oder nur in einem nicht auftrennbaren Gemisch mit dem Edukt oder mit weiteren Nebenprodukten erhalten werden. Die Synthese der Verbindung **6.14** wurde schließlich ausgesetzt und der Fokus wurde auf die Darstellung des potentiellen Inhibitors **6.15** mit der 1,2-verknüpften Aromatenbrücke gelegt.

**Schema 6.5:** Darstellung der Fehlgeschlagenen LINDLAR-Reduktionen.


## Synthese der Verbindung 6.15

Die Darstellung von Verbindung 6.15 erfolgte in zwei Schritten ausgehend vom Bromphenol 6.14g (Schema 6.6). In einer SUZUKI-MIYAUURA-Reaktion mit der Boronsäure 6.15b konnte der Aldehyd 6.15a in guter Ausbeute (75%) erhalten werden. Wie zuvor wurde die Aldehydfunktion mit 1,2-Dihydroxybenzol zur Endstufe 6.15 umgesetzt. Auch bei dieser Reaktion konnte lediglich eine moderate Ausbeute von 13% erzielt werden.

### Schema 6.6: Darstellung der Verbindung 6.15.



Bedingungen: **a)** Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, DME/H<sub>2</sub>O (2:1), 80 °C, über Nacht; **b)** 1,2-Dihydroxybenzol, MgSO<sub>4</sub>, *p*-TsOH (3 mol%), Benzol, DEAN STARK, 110 °C, 2 d.

## 6.4 Löslichkeit und biologische Ergebnisse

### 6.4.1 Löslichkeit

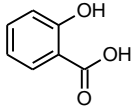
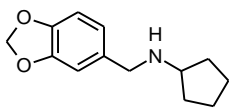
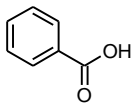
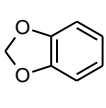
Die Löslichkeit der auf ihre inhibitorische Wirkung hin getesteten Verbindungen wurde von Dr. SANDRINE MARCHAIS-OBERWINKLER bestimmt. Entsprechend der in **Kapitel 3** vorgestellten Methode wurde die Löslichkeit der Verbindungen bei verschiedenen Konzentrationen in 100 mM Phosphatpuffer (pH = 8.0) evaluiert. Bis auf Verbindung **6.15** (125-150  $\mu$ M) konnte für alle Endstufen eine Löslichkeit von >500  $\mu$ M beschrieben werden.

### 6.4.2 17 $\beta$ -HSD14 Inhibition

Um die inhibitorische Aktivität der synthetisierten Verbindungen beurteilen zu können wurde der fluoreszenzbasierte Assay verwendet wie er bereits in **Kapitel 3** ausführlich beschrieben wurde. Die Resultate sind als prozentuale Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 250  $\mu$ M angegeben. Die Inhibitionskonstante  $K_i$  wurde für die interessantesten Verbindungen experimentell bei zehn Konzentrationen zwischen 7  $\mu$ M und 250  $\mu$ M bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der quadratischen Gleichung nach MORRISON für „tight binding inhibitors“<sup>9</sup>, da auf Grund einer ähnlichen Inhibitor- und Proteinkonzentration keine klassische Kinetik<sup>10,11</sup> vorlag (vgl. **Kapitel 3**).

Für die *screening hits* **6.1** und **6.2** als auch die Startfragmente **6.3** und **6.10** konnte eine geringe (**6.1**: 15% Inhibition) bzw. keine inhibitorische Wirkung (**6.2**, **6.3** und **6.10**) bei einer Inhibitorkonzentration von 250  $\mu$ M bestimmt werden (**Tabelle 6.1**).

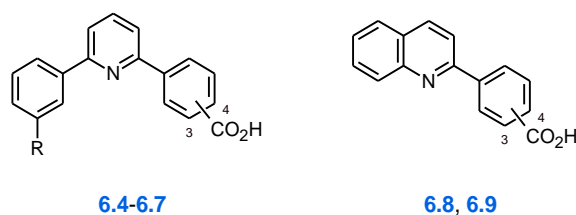
**Tabelle 6.1:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 der *screening hits* **6.1** und **6.2**, und der Fragmente **6.3** und **6.10**.

Verb.	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 250 $\mu$ M) <sup>a</sup>		
<b>6.1</b>	16	<b>6.1</b>	<b>6.2</b>
<b>6.2</b>	k.i.		
<b>6.3</b>	k.i.	<b>6.3</b>	<b>6.10</b>
<b>6.10</b>	k.i.		

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen; k.i.: keine Inhibition.

Ausgehend vom Fragment **6.3** wurden im ersten Teil (*fragment-growing*) die Verbindungen **6.4-6.9** dargestellt. Nach der Erweiterung um ein Phenylpyridinmotiv bzw. um einen Chinolinsubstituenten konnte für diese Liganden eine inhibitorische Wirkung von 76-93% bei 250  $\mu$ M bestimmt werden. Zudem war es möglich für die äquipotenten Inhibitoren die Affinität gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 zu bestimmen ( $K_i$  = 1.9-8.7  $\mu$ M, **Tabelle 6.2**).

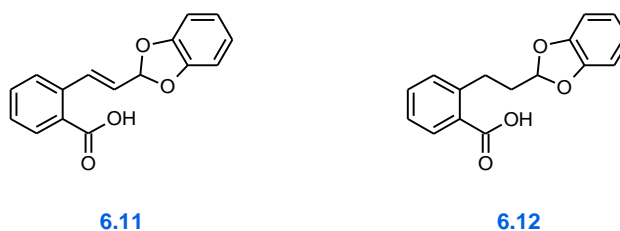
**Tabelle 6.2:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) der Verbindungen **6.4-6.9**.



Verb.	R	Pos. CO <sub>2</sub> H	17 $\beta$ -HSD14 (% Inh. bei 250 $\mu$ M) <sup>a</sup>	$K_i$ ( $\mu$ M) <sup>a</sup>
<b>6.4</b>	H	3	76	8.7 $\pm$ 0.8
<b>6.5</b>	OH	3	93	1.9 $\pm$ 0.1
<b>6.6</b>	H	4	80	6.8 $\pm$ 1.2
<b>6.7</b>	OH	4	83	4.8 $\pm$ 1.0
<b>6.8</b>	-	3	86	8.1 $\pm$ 0.8
<b>6.9</b>	-	4	90	7.0 $\pm$ 0.5

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen.

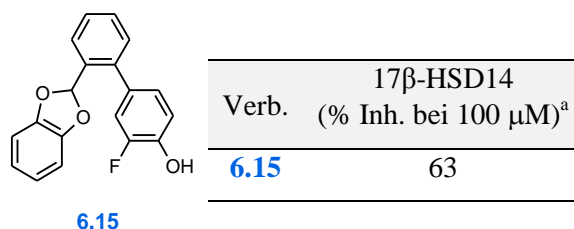
Die während des zweiten Teils entworfene Verbindung **6.11** zeigt eine moderate inhibitorische Wirkung unter den getesteten Bedingungen (44% Inhibition bei 250  $\mu$ M). Das hydrierte Analogon **6.12** zeichnet sich im Vergleich dazu durch eine höhere Potenz gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 aus (67% Inhibition bei 250  $\mu$ M;  $K_i$  = 17.6  $\mu$ M, **Tabelle 6.3**).

**Tabelle 6.3:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 der Verbindungen **6.11** und **6.12**.


Verb.	17 $\beta$ -HSD14 % Inh. bei 250 $\mu$ M <sup>a</sup>	$K_i$ ( $\mu$ M) <sup>a</sup>
<b>6.11</b>	44%	n.b.
<b>6.12</b>	67%	17.6 $\pm$ 0.5

<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen. n.b.: nicht bestimmt.

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Verbindungen besitzt Verbindung **6.15** eine geringere Löslichkeit. Dementsprechend wurde die inhibitorische Wirkung von 60% bei einer Inhibitorkonzentration von 100  $\mu$ M bestimmt (**Tabelle 6.4**).

**Tabelle 6.4:** Inhibition von 17 $\beta$ -HSD14 und Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von Verbindung **6.11**.


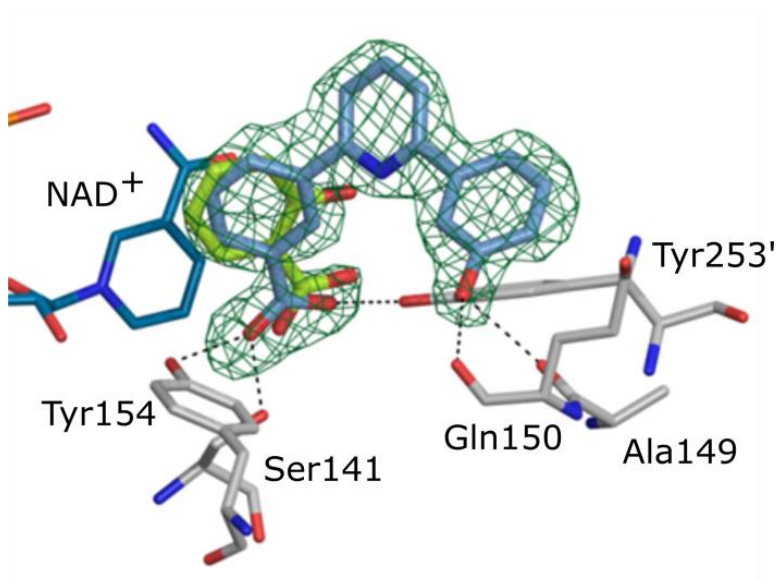
<sup>a</sup> Rekombinant exprimiertes, gereinigtes 17 $\beta$ -HSD14 Enzym, Fluoreszenzassay, Substrat E2 [32  $\mu$ M], NAD<sup>+</sup> [1.2 mM], 25°C, Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Wiederholungen.

## 6.5 Kristallstrukturanalyse

Um die berechneten Bindungsposen der entworfenen Verbindungen überprüfen zu können, wurden die dargestellten Inhibitoren von NICOLE BERTOLETTI (AG KLEBE, Philipps-Universität Marburg) mit Hilfe von *soaking* Experimenten versucht zu kristallisieren. Im Zuge dessen war es möglich, Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit den Inhibitoren **6.5** und **6.12** zu erhalten. Die Ergebnisse sind Teil einer Studie, die noch nicht vollständig abgeschlossen sind. Dementsprechend sind die Kristallstrukturen noch nicht in die PDB deponiert worden und als vorläufige Resultate zu sehen. Daher wurde unter anderem auf die Angabe der Längen von H-Brücken verzichtet.

### 6.5.1 Beschreibung der Kristallstrukturen

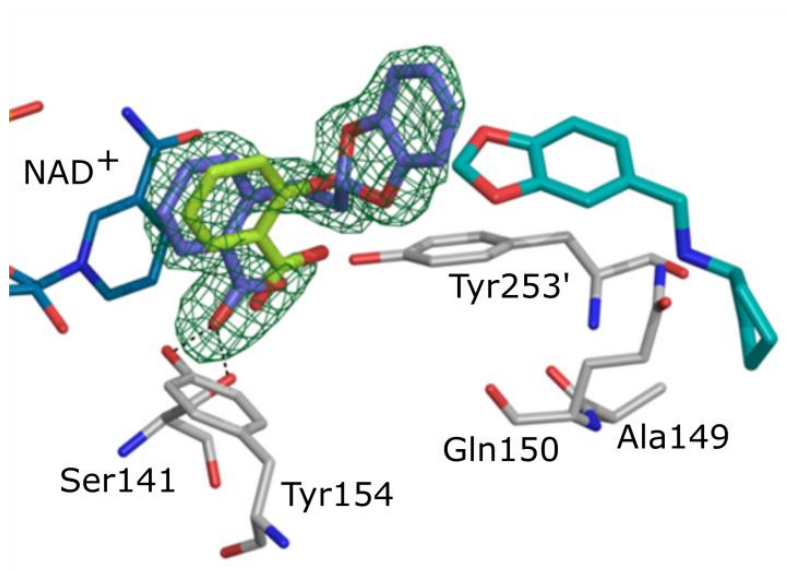
**Abb. 6.9** beschreibt eine Überlagerung der Kristallstrukturen der Verbindung **6.5** mit der des ursprünglichen Fragmenttreffers Salicylsäure **6.1**. Es lässt sich feststellen, dass die Carbonsäurebausteine beider Verbindungen Interaktionen mit Tyr154 und Ser141 der katalytischen Triade bzw. mit Tyr253' des benachbarten Monomers im funktionellen Tetramers eingehen. Generell sind die Bindungsmodi beider Benzoesäurebausteine in diesen Strukturen weitestgehend deckungsgleich. Das restliche Phenylpyridinmotiv des Inhibitors **6.5** bindet in einer ähnlichen Weise in der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14, wie es beispielsweise für das Pyridinketon **3.8** beschrieben wurde (vgl. **Kapitel 3**). Der zentrale Pyridinring ist in einer hydrophoben Region mit Trp192 und Leu195 (nicht veranschaulicht) verankert. Zusätzlich können für die 3-OH Gruppe am Phenylring H-Brücken zu den Carbonylgruppen des *backbones* von Ala149 und Gln150 beobachtet werden.



**Abb. 6.9:** Überlagerung der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit Fragment **6.1** und Inhibitor **6.5**. Die Kohlenstoffatome sind für **6.1** in hellgrün und für **6.5** in blau veranschaulicht. Die  $F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte für den Inhibitor **6.5** ist in dunkelgrün bei 3 $\sigma$  angegeben. H-Brücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.



Auch für den Inhibitor **6.12** kann eine tiefe Lokalisation in der aktiven Tasche des Targets beobachtet werden. Das Carbonsäuremotiv interagiert ebenfalls mit den katalytischen Aminosäuren Tyr154 und Ser141, sodass die Benzoessäurebausteine des Fragments **6.1** und des Inhibitors **6.12** vergleichbare Bindungsmodi aufweisen, wobei der Ligand **6.12** etwas tiefer in der Bindetasche positioniert wird. Das Benzodioxolmotiv ist zum übrigen Teil des Moleküls abgewinkelt, sodass es hydrophobe Kontakte mit Trp192 und Leu195 (nicht veranschaulicht) eingehen kann.

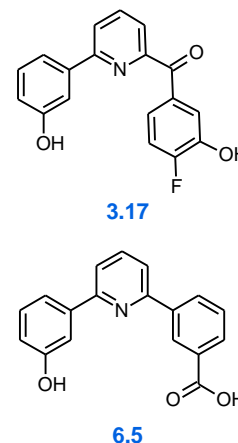


**Abb. 6.10:** Überlagerung der Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit den Fragmenten **6.1** und **6.2** und dem Inhibitor **6.12**. Die Kohlenstoffatome sind für **6.1** in hellgrün, **6.2** in türkis und für **6.12** in blau-violett veranschaulicht. Die  $F_o - F_c$ -Differenzelektronendichte für den Inhibitor **6.12** ist in dunkelgrün bei 3 $\sigma$  verbildlicht. H-Brücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

## 6.6 Diskussion der Ergebnisse

Ausgehend vom Fragment **6.1** wurde im ersten Teil dieses Kapitels ein *fragment growing* Ansatz verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass durch diese Vorgehensweise für die entworfenen Verbindungen eine verbessert inhibitorische Aktivität zu erzielen ist (**6.1**: 15% Inhibition vs. **6.4-6.9**: 76-93% Inhibition bei 250  $\mu$ M). Aus der Kristallstruktur von Verbindung **6.5** kann beobachtet werden, dass der Ligand mit der aktiven Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 interagiert und der modellierten Bindungspose (**Abb. 6.3A**) sehr nahe kommt (**Abb. 6.9**). Dabei bindet vor allem das Benzoessäuremotiv des Inhibitors und des Fragments **6.1** auf nahezu identische Weise, sodass das Carbonsäuremotiv beider Strukturen Wechselwirkungen mit Tyr154 und Ser141 eingeht. Diese Strategie des Inhibitor designs konnte somit erfolgreich umgesetzt werden. Ebenfalls können anhand der Kristallstruktur H-Brückenbindungen der 3-OH Gruppe am Phenylring mit den *backbone* Carbonylgruppen von Ala149 und Gln150 identifiziert werden. Beim Vergleich der Inhibitionskonstanten der Verbindungen **6.4-6.9** ist jedoch kein signifikanter Unterschied festzustellen ( $K_i$  = 1.9-8.7  $\mu$ M), sodass diese Interaktionen mit dem Protein als schwach zu bewerten sind.

Zur Beurteilung der Carbonsäure als Interaktionspartner kann Verbindung **6.5** aufgrund des ähnlichen Substitutionsmusters am Phenylpyridinbaustein mit Verbindung **3.17** (**Abb. 6.11**) verglichen werden. Dementsprechend ist das Benzoessäuremotiv im Vergleich zum fluorierten Phenolbaustein des Inhibitors **3.17** im Hinblick auf die inhibitorische Wirkung der Liganden gegenüber 17 $\beta$ -HSD14 benachteiligt (**3.17**:  $K_i$  = 7 nM vs. **6.5**:  $K_i$  = 1.9  $\mu$ M). Es ist davon auszugehen, dass die Carbonsäure deprotoniert vorliegt und somit nicht als H-Brücken Donor fungieren kann, der in **Kapitel 3** als essentiell für eine starke Interaktion mit Tyr154 beschrieben wurde. Die bereits zu beobachtende inhibitorische Aktivität von Salicylsäure **6.1** scheint somit vorrangig aus der Interaktion mit Ser141 zu resultieren.



**Abb. 6.11:** Vergleich der Strukturen von **3.17** und **6.5**.

Im zweiten Ansatz wurde angestrebt die Fragmente **6.1** und **6.2** miteinander zu verbinden, was durch den Entwurf der Inhibitoren **6.11** und **6.12** realisiert werden sollte. Auch hier kann für beide Verbindungen eine im Vergleich zu den Startfragmenten gesteigerte inhibitorische Aktivität verzeichnet werden (**6.11**: 44% Inhibition; **6.12**: 67% Inhibition bei 250  $\mu$ M). Aus der Kristallstruktur von **6.12** im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14 kann allerdings beobachtet werden, dass lediglich der Benzoessäurebaustein des Inhibitors den Bindungsmodus des entsprechenden Fragments **6.1** teilt (**Abb. 6.10**). Für das Benzodioxolmotiv kann hingegen im Vergleich zum Fragment **6.2** eine im Raum deutlich verschobene Bindung in die Bindetasche des Targets beobachtet werden. Da es das

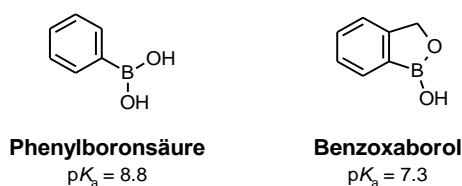
ursprüngliche Ziel des Inhibitor designs war, die Bindungsposen der Fragmentbausteine zu erhalten, wurde diese Prämisse während dem *linking* Ansatz nur teilweise umgesetzt. Auch für Verbindung **6.11** ist aufgrund der im Vergleich zum Liganden **6.12** geringeren inhibitorische Aktivität eine Bindung nach der modellierten Pose unwahrscheinlich. Die postulierten H-Brücken des Benzodioxolbausteins mit dem Protein sollten zu einer weiteren Steigerung der Potenz gegenüber dem Target führen. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die Anfertigung von modellierten Strukturen generell eine für *fragment linking* Studien verlässliche Methode ist, oder ob *docking*-Experimente die bessere Wahl wären. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob die Bindung des Fragments **6.2** an das Protein durch den *N*-methylcyclopentanamin Substituenten beeinflusst wird. So könnte dieser ein tiefes Eindringen in die aktive Tasche, wie es für den Inhibitor **6.12** zu beobachten ist, verhindern und in der erhaltenen Bindungspose von **6.2** bewirken.

Im dritten Ansatz sollte das Benzodioxolmotiv des Fragments **6.2** mit dem 3-OH/4-F Phenylmotiv verbunden werden, für das eine starke Bindung zu Tyr154 der katalytischen Triade nachgewiesen wurde (vgl. **Kapitel 3**). Nach diesem Ansatz konnte Verbindung **6.15** dargestellt werden, für das im Vergleich zu **6.2** eine erhöhte inhibitorische Aktivität beobachtet werden kann (63% Inhibition bei 100  $\mu$ M). Die Bindungspose dieser Verbindung entsprechend der modellierten Struktur konnte bislang nicht durch eine Kristallstruktur überprüft werden, was in naher Zukunft angestrebt werden sollte.

## 6.7 Fazit

Ausgehend von einem *fragment-based lead discovery* Ansatz konnten Liganden identifiziert werden, die in die aktive Tasche von 17 $\beta$ -HSD14 binden. Aus dem schwach potenten *screening hit* **6.1** (15% Inhibition bei 250  $\mu$ M) wurden in einem *fragment-growing* Ansatz Verbindungen mit einer im Vergleich zum ursprünglichen Fragment gesteigerten inhibitorischen Aktivität (bis zu 93% Inhibition bei 250  $\mu$ M) entworfen. Das Ziel der Studie konnte daher für diesen Ansatz erfolgreich umgesetzt werden, und bestätigt, dass ein *fragment-based lead discovery* eine Option zur Entdeckung alternativer Leitstrukturen bei der Suche nach 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren ist.

Dennoch ist für die dargestellten Carbonsäurederivate nur eine geringere inhibitorische Wirkung gegenüber dem Target nachzuweisen, als dies für die phenolbasierenden Inhibitoren aus **Kapitel 3** der Fall ist (z.B.: **3.17**:  $K_i = 7$  nM vs. **6.5**:  $K_i = 1.9$   $\mu$ M). Es ist anzunehmen, dass die Carbonsäuregruppe der Inhibitoren auf Grund ihres  $pK_a$ -Werts deprotoniert vorliegt und somit nicht als H-Brücken-Donor für die benachbarten Gruppen der Aminosäuren fungieren kann. Diese Bindung wurde für die Pyridinketone (vgl. **Kapitel 3**) jedoch als essentiell für eine starke Interaktion mit Tyr154 beschrieben. Bei der Weiterentwicklung der neuen Leitstrukturen könnten die Carbonsäuremotive gegen Bausteine substituiert werden, deren  $pK_a$ -Werte mit denen des 3-OH/4-F Phenylelements (**3.17**,  $pK_a = 7.8$ , vgl. **Tabelle 3.9**) vergleichbar sind. Hierzu würden sich Derivate der Phenylboronsäure ( $pK_a = 8.8$ ), oder die von TOMSHO *et al.* untersuchten Benzoxaborole anbieten (Benzoxaborol:  $pK_a = 7.3$ , **Abb. 6.12**).<sup>12</sup> Durch die Einführung von elektronenziehenden und elektronenschiebenden Substituenten an letzterem Motiv konnten die Autoren nachweisen, dass die  $pK_a$ -Werte dieser Gruppierungen leicht zu variieren sind.



**Abb. 6.11:** Vergleich der  $pK_a$ -Werte von Phenylboronsäure und Benzoxaborol.<sup>12</sup>

## 6.8 Experimental Section

### 6.8.1 Chemistry

#### Chemical methods

Chemical names follow IUPAC nomenclature.

Starting materials were purchased from Acros Organics, Alfa Aesar, Combi-Blocks, Roth and Sigma Aldrich and were used without further purification. Anhydrous tetrahydrofuran was freshly distilled from sodium benzophenone ketyl.

Microwave irradiation experiments were carried out in a CEM-Discover apparatus.

Column chromatography was performed on silica gel (0.04-0.063 mm, Macherey-Nagel) and reaction progress was monitored by TLC on aluminium sheets (Silicagel 60 F254, Merck). Visualization was accomplished with UV light at 254 nm and 366 nm, respectively.

Preparative HPLC was performed with a Varian PrepStar 218 gradient system using a ProStar 320 detector. A ProntoSIL C18 column (5.0  $\mu$ m, 120 Å, 250-32 mm) was used with an acetonitrile/water gradient containing 0.1% TFA at a flow rate of 20 ml/min. All solvents were HPLC grade. Detection was performed at a wavelength of 254 nm.

Mass spectrometry was performed on a Q-Trap 2000 (Applied Biosystems) equipped with an electrospray interface (ESI).

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were measured on a JEOL ECX-400 spectrometer (at 400 MHz and 100 MHz, respectively). Chemical shifts are reported in  $\delta$  (parts per million: ppm), using residual peaks for the deuterated solvents as internal standard: 2.05 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 29.8 ppm and 206.3 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR), acetone- $d_6$ ; 7.26 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 77.2 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR),  $\text{CDCl}_3$ ; 2.50 ppm ( $^1\text{H}$  NMR), 39.5 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR), DMSO- $d_6$ . Signals are described as s, bs, d, t, q, dd, ddd, dt and m for singlet, broad signal, doublet, triplet, doublet of doublets, doublet of doublet of doublets, doublet of triplets and multiplet, respectively. All coupling constants ( $J$ ) are given in Hertz (Hz).

Infrared spectroscopy was performed on a Bruker ALPHA FT-IR spectrometer as neat sample.

All tested compounds have  $\geq 95\%$  chemical purity as evaluated by HPLC. The Shimadzu-system consisted of a LC-20AT pump, an SIL-20A autosampler and a SPD-M20A PDA detector. The system was operated by the standard software LCsolution. A RP C18 NUCLEODUR<sup>®</sup> (125 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m) column (Macherey-Nagel) was used. All solvents were HPLC grade. In a gradient run the percentage of acetonitrile in water was increased from initial concentration of 30% at 0 min to 90% at 15 min and kept at 90% for 5 min. The injection volume was 20  $\mu$ l at a flow rate of 1.00 ml/min. UV spectra were recorded at a wavelength of 254 nm.

## General procedures

### General procedure for Suzuki coupling

#### Method 6.1

A mixture of arylbromide (1.0 eq), boronic acid (1.2-1.3 eq), cesium carbonate (4.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.02 eq) was solved in DME/water (2:1), degassed and charged with argon. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The reaction mixture was cooled down to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.

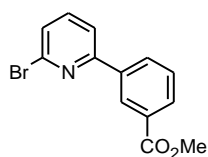
### General procedure for ester hydrolysis

#### Method 6.2

To a solution of ester derivative (1.0 eq) in methanol lithium hydroxide (1.0 M, 5.0 eq) was added and the reaction mixture was stirred overnight at 40 °C. The mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate. The organic phase was extracted with saturated sodium bicarbonate and the combined aqueous phase was adjusted to pH 2 by means of hydrochloric acid (1.0 M). The aqueous phase was extracted with ethyl acetate and the combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and filtered. Evaporation to dryness under reduced pressure afforded the analytically pure compound.

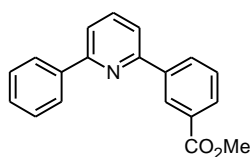
## Detailed synthesis procedures and compound characterization

### Methyl 3-(6-bromopyridin-2-yl)benzoate (**6.4b**).



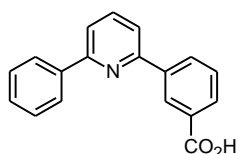
A solution of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (1.94 g, 8.0 mmol, 4.0 eq), cesium carbonate (2.65 g, 8.0 mmol, 4.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (53 mg, 2 mol%) in DME/water (2:1, 24 ml) was degassed and charged with argon.

A solution of 3-(methoxycarbonyl)phenylboronic acid (360 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) was added over a period of 3 h at 80 °C and stirred for an additional hour at 80 °C. The reaction mixture was cooled down to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1→9:1) to give 396 mg (1.36 mmol, 68%) of the analytically pure compound. C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub>; MW: 292; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  8.60 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.30 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 1.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 7.8 Hz, 0.6 Hz, 1H), 8.04 (ddd, *J* = 7.7 Hz, 1.6 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.87 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 7.9 Hz, 0.6 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  165.9, 156.1, 141.4, 140.7, 137.3, 131.2, 130.4, 130.3, 129.5, 127.3, 127.1, 119.8, 52.3; MS (ESI): 292, 294 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl 3-(6-phenylpyridin-2-yl)benzoate (6.4a).**


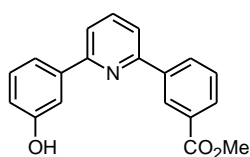
According to **method 6.1** the title compound was prepared by reaction of methyl 3-(6-bromopyridin-2-yl)benzoate (**6.4b**) (151 mg, 0.52 mmol, 1.0 eq) with phenylboronic acid (77 mg, 0.63 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml).

The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1 $\rightarrow$ 9:1) to give 93 mg (0.32 mmol, 62%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>; MW: 289; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.76 (dt, *J* = 1.8 Hz, 0.5 Hz, 1H), 8.48 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 1.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.22-8.18 (m, 2H), 8.05 (ddd, *J* = 7.7 Hz, 1.7 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.03-7.97 (m, 3H), 7.69 (dt, *J* = 7.8 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.58-7.52 (m, 2H), 7.51-7.46 (m, 1H), 3.91 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  166.1, 155.9, 154.5, 139.2, 138.6, 138.5, 131.3, 130.3, 129.6, 129.4, 129.2, 128.8, 127.1, 126.6, 119.5, 119.1, 52.3; MS (ESI): 290 (M+H)<sup>+</sup>.

**3-(6-Phenylpyridin-2-yl)benzoic acid (6.4).**


According to **method 6.2** the title compound was prepared by hydrolysis of methyl 3-(6-phenylpyridin-2-yl)benzoate (**6.4a**) (80 mg, 0.28 mmol, 1.0 eq) in methanol (4.0 ml) to give 49 mg (0.18 mmol, 64%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>; MW: 275; mp: 224-225 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,

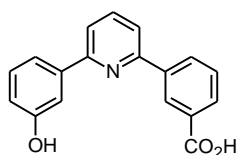
500 MHz):  $\delta$  13.09 (bs, 1H), 8.76 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.44 (ddd, *J* = 7.8 Hz, 1.8 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.22-8.19 (m, 2H), 8.06-8.03 (m, 1H), 8.03-7.98 (m, 2H), 7.97 (dd, *J* = 6.5 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.57-7.53 (m, 2H), 7.50-7.46 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz):  $\delta$  167.2, 155.8, 154.7, 139.0, 138.6, 138.5, 131.4, 130.9, 129.8, 129.2, 127.1, 128.8, 127.3, 126.6, 119.3, 119.1; IR: 1684, 746 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 276 (M+H)<sup>+</sup>; HPLC analysis: retention time = 12.42 min; peak area, 99.3%, HPLC-method A.

**Methyl 3-[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]benzoate (6.5a).**


According to **method 6.1** the title compound was prepared by reaction of methyl 3-(6-bromopyridin-2-yl)benzoate (**6.4b**) (142 mg, 0.49 mmol, 1.0 eq) with 3-hydroxyphenylboronic acid (85 mg, 0.62 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography

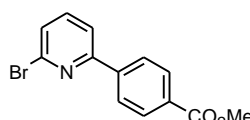
(cyclohexane/ethyl acetate 5:1) to give 119 mg (0.39 mmol, 80%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>; MW: 305; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.61 (s, 1H), 8.75-8.73 (m, 1H), 8.47-8.43 (m, 1H), 8.07-8.03 (m, 1H), 8.01-7.96 (m, 2H), 7.91-7.86 (m, 1H), 7.69 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.64-7.62 (m, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.0 Hz, 2.5 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  166.2, 157.8, 156.0, 154.7, 139.9, 139.3, 138.5, 131.3, 130.3, 129.8, 129.6, 129.3, 127.1, 119.4, 119.1, 117.4, 116.3, 113.4, 52.3; MS (ESI): 306 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3-[6-(3-Hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]benzoic acid (6.5).



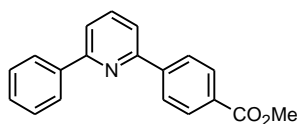
According to **method 6.2** the title compound was prepared by hydrolysis of methyl 3-[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]benzoate (**6.5a**) (99 mg, 0.32 mmol, 1.0 eq) in methanol (4.0 ml) to give 90 mg (0.31 mmol, 97%) of the analytically pure compound.  $C_{18}H_{13}NO_3$ ; MW: 291; **mp**: 225-226 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  13.09 (bs, 1H), 9.60 (bs, 1H), 8.74 (t,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 8.42 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.04 (ddd,  $J$  = 7.6 Hz, 1.7 Hz, 1.3 Hz, 1H), 8.00-7.96 (m, 2H), 7.88 (dd,  $J$  = 6.1 Hz, 2.6 Hz, 1H), 7.67 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 0.3 Hz, 1H), 7.64 (dd,  $J$  = 1.8 Hz, 0.3 Hz, 1H), 7.58 (ddd,  $J$  = 7.7 Hz, 1.6 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.33 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (ddd,  $J$  = 8.1 Hz, 2.5 Hz, 0.9 Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta$  167.2, 157.8, 155.9, 154.7, 140.0, 139.1, 138.4, 131.4, 130.8, 129.8, 129.8, 129.1, 127.3, 119.3, 119.0, 117.4, 116.3, 113.4; **IR**: 1683, 755  $cm^{-1}$ ; **MS** (ESI): 292 (M+H) $^+$ ; **HPLC** analysis: retention time = 8.07 min; peak area, 96.6%, HPLC-method A.

### Methyl 4-(6-bromopyridin-2-yl)benzoate (6.6b).



A solution of 2,6-dibromopyridine (**3.6d**) (474 mg, 2.0 mmol, 4.0 eq), cesium carbonate (651 mg, 2.0 mmol, 4.0 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)-palladium (12 mg, 2 mol%) in DME/water (2:1, 6 ml) was degassed and charged with argon. A solution of 4-(methoxycarbonyl)phenylboronic acid (90 mg, 0.5 mmol, 1.0 eq) was added over a period of 1 h at 80 °C and stirred for an additional hour at 80 °C. The reaction mixture was cooled down to room temperature, quenched with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1 $\rightarrow$ 9:1) to give 79 mg (0.27 mmol, 54%) of the analytically pure compound.  $C_{13}H_{10}BrNO_2$ ; MW: 292;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  8.21-8.18 (m, 2H), 8.12 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 0.6 Hz, 1H), 8.09-8.06 (m, 2H), 7.89 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.68 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 0.5 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  165.8, 156.0, 141.5, 141.0, 140.7, 130.4, 129.7, 127.6, 126.9, 120.3, 52.2; **MS** (ESI): 292, 294 (M+H) $^+$ .

### Methyl 4-(6-phenylpyridin-2-yl)benzoate (6.6a).

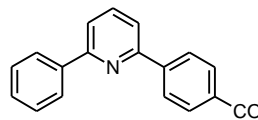


According to **method 6.1** the title compound was prepared by reaction of methyl 4-(6-bromopyridin-2-yl)benzoate (**6.6b**) (143 mg, 0.49 mmol, 1.0 eq) with phenylboronic acid (72 mg, 0.59 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1 $\rightarrow$ 9:1) to give 94 mg (0.32 mmol, 66%) of the analytically pure compound.  $C_{19}H_{15}NO_2$ ; MW: 289;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  8.39-8.33 (m, 2H), 8.24-8.19 (m, 2H), 8.13-8.08 (m, 2H), 8.05-7.98 (m, 3H), 7.57-7.45 (m, 3H), 3.90 (m, 3H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  166.1, 155.9,



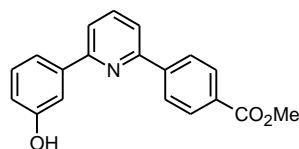
154.3, 138.6, 138.5, 130.3, 129.7, 129.4, 128.9, 126.9, 126.7, 119.7, 119.7, 52.3; **MS** (ESI): 290 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4-(6-Phenylpyridin-2-yl)benzoic acid (6.6).



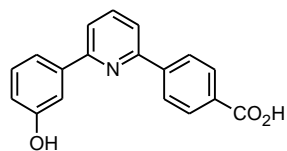
According to **method 6.2** the title compound was prepared by hydrolysis of methyl 4-(6-phenylpyridin-2-yl)benzoate (**6.6a**) (82 mg, 0.28 mmol, 1.0 eq) in methanol (6.0 ml) to give 66 mg (0.24 mmol, 86%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>; MW: 275; **mp**: 244-245 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  13.01 (bs, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.22 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.04-7.97 (m, 3H), 7.57-7.52 (m, 2H), 7.48 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz):  $\delta$  167.1, 155.9, 154.5, 142.6, 138.5, 138.5, 131.1, 129.8, 129.2, 128.8, 126.7, 126.6, 119.6, 119.5; **IR**: 1682, 755, 695 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 276 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 13.15 min; peak area, 99.3%, HPLC-method A.

#### Methyl 4-[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]benzoate (6.7a).

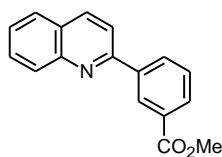


According to **method 6.1** the title compound was prepared by reaction of methyl 4-(6-bromopyridin-2-yl)benzoate (**6.6b**) (224 mg, 0.77 mmol, 1.0 eq) with 3-hydroxyphenylboronic acid (127 mg, 0.92 mmol, 1.2 eq) in DME/water (9.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 5:1 $\rightarrow$ 3:1) to give 151 mg (0.50 mmol, 64%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>; MW: 305; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.59 (s, 1H), 8.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.04-7.95 (m, 2H), 7.95-7.86 (m, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 7.7 Hz, 1.9 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  166.1, 157.9, 156.0, 154.2, 143.0, 139.9, 138.5, 129.9, 129.9, 129.7, 126.9, 119.8, 119.6, 117.5, 116.4, 113.5, 52.3; **MS** (ESI): 306 (M+H)<sup>+</sup>.

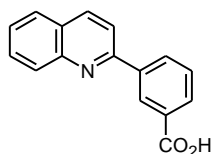
#### 4-[6-(3-Hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]benzoic acid (6.7).



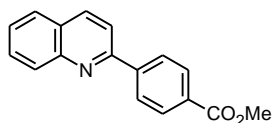
According to **method 6.2** the title compound was prepared by hydrolysis of methyl 4-[6-(3-hydroxyphenyl)pyridin-2-yl]benzoate (**6.7a**) (123 mg, 0.4 mmol, 1.0 eq) in methanol (4.0 ml) to give 85 mg (0.29 mmol, 72%) of the analytically pure compound. C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>; MW: 291; **mp**: 259-260 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz):  $\delta$  13.02 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.03-7.96 (m, 2H), 7.93-7.87 (m, 1H), 7.68-7.65 (m, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.32 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.8 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz):  $\delta$  167.1, 157.8, 155.9, 154.4, 142.6, 139.9, 138.4, 131.1, 129.7, 126.6, 119.6, 119.4, 117.4, 116.3, 116.3, 113.4; **IR**: 1677, 762 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 292 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 8.68 min; peak area, 99.7%, HPLC-method A.

**Methyl 3-(quinolin-2-yl)benzoate (6.8a).**


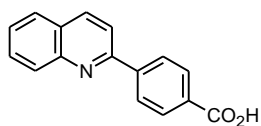
According to **method 6.1** the title compound was prepared by reaction of 2-bromoquinoline (**5.8c**) (119 mg, 0.57 mmol, 1.0 eq) with 3-(methoxycarbonyl)-phenylboronic acid (134 mg, 0.74 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1 $\rightarrow$ 9:1) to give 122 mg (0.46 mmol, 81%) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>; MW: 263; **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.88-8.84 (m, 1H), 8.55-8.47 (m, 2H), 8.23-8.17 (m, 1H), 8.15-8.10 (m, 1H), 8.10-8.06 (m, 1H), 8.04-8.00 (m, 1H), 7.84-7.77 (m, 1H), 7.74-7.68 (m, 1H), 7.66-7.59 (m, 1H), 3.93 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  166.2, 154.9, 147.5, 139.1, 137.6, 131.9, 130.4, 130.2, 130.1, 129.5, 129.2, 127.9, 127.7, 127.2, 126.8, 118.8, 52.4; **MS** (ESI): 264 (M+H)<sup>+</sup>.

**3-(Quinolin-2-yl)benzoic acid (6.8).**


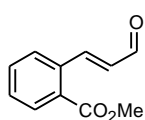
According to **method 6.2** the title compound was prepared by hydrolysis of 3-(quinolin-2-yl)benzoic acid (**6.8a**) (108 mg, 0.41 mmol, 1.0 eq) in methanol (5.0 ml) to give 66 mg (0.26 mmol, 65%) of the analytically pure compound. C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>; MW: 249; **mp**: 220-221 °C; **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  13.13 (s, 1H), 8.88-8.84 (m, 1H), 8.52-8.46 (m, 2H), 8.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.10-8.05 (m, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.83-7.77 (m, 1H), 7.69 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.66-7.59 (m, 1H); **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): 167.2, 155.1, 147.5, 139.0, 137.4, 131.5, 131.4, 130.2, 130.0, 129.2, 129.1, 127.9, 127.8, 127.1, 126.7, 118.7; **IR**: 1673, 808, 758, 684 cm<sup>-1</sup>; **MS** (ESI): 250 (M+H)<sup>+</sup>; **HPLC** analysis: retention time = 11.00 min; peak area, 99.8%, HPLC-method B.

**Methyl 4-(quinolin-2-yl)benzoate (6.9a).**


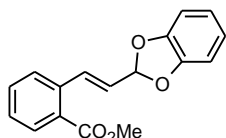
According to **method 6.1** the title compound was prepared by reaction of 2-bromoquinoline (**5.8c**) (104 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) with 4-(methoxycarbonyl)phenylboronic acid (110 mg, 0.60 mmol, 1.2 eq) in DME/water (6.0 ml). The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 15:1) to give 100 mg (0.38 mmol, 76%) of the analytically pure compound. C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>; MW: 263; **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 8.13-8.09 (m, 1H), 8.05-8.00 (m, 1H), 7.84-7.79 (m, 1H), 7.67-7.61 (m, 1H), 3.90 (s, 3H); **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  166.0, 154.8, 147.5, 142.9, 137.5, 130.3, 130.2, 129.7, 129.2, 127.9, 127.5, 127.3, 127.0, 119.0, 52.3; **MS** (ESI): 264 (M+H)<sup>+</sup>.

**4-(Quinolin-2-yl)benzoic acid (6.9).**


According to **method 6.2** the title compound was prepared by hydrolysis of 4-(quinolin-2-yl)benzoic acid (**6.9a**) (87 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq) in methanol (6.0 ml) to give 76 mg (0.30 mmol, 92%) of the analytically pure compound.  $C_{16}H_{11}NO_2$ ; MW: 249; mp: 252-253 °C;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  13.07 (s, 1H), 8.51 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 8.40 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 8.22 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 8.12 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 8.13-8.09 (m, 1H), 8.05-8.00 (m, 1H), 7.84-7.78 (m, 1H), 7.66-7.60 (m, 1H);  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  167.0, 155.0, 147.5, 142.5, 137.4, 131.4, 130.1, 129.8, 128.2, 127.8, 127.3, 127.2, 126.9, 118.9; IR: 1682, 826, 804, 701  $cm^{-1}$ ; MS (ESI): 250 ( $M+H$ ) $^+$ ; HPLC analysis: retention time = 11.40 min; peak area, 99.3%, HPLC-method B.

**Methyl 2-[(E)-3-oxopropenyl]benzoate (6.11b).**


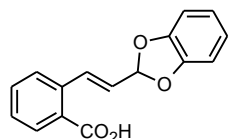
A mixture of methyl 2-iodobenzoate (**6.11c**) (1.31 g, 5.0 mmol, 1.0 eq), acrolein (560 mg, 10.0 mmol, 2.0 eq), potassium carbonate (1.73 g, 12.5 mmol, 2.5 eq), tetrabutylammonium chloride (1.36 g, 5.0 mmol, 1.0 eq) and palladium(II) acetate (56mg, 5 mol%) was suspended in acetonitrile (4.0 ml), degassed and charged with argon. The reaction mixture was exposed to microwave irradiation (1 h, 150 W, 80 °C, open vessel). The same amount of catalyst was added and the reaction was continued for 1 h with same conditions. The reaction mixture was cooled to room temperature, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ ethyl acetate 19:1  $\rightarrow$  9:1) to give 762 mg (4.01 mmol/ 80%) of the analytically pure compound.  $C_{11}H_{10}O_3$ ; MW: 190;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.77 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 8.44 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H), 8.03 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.59 (dt,  $J$  = 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.50 (dt,  $J$  = 7.6 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.61 (dd,  $J$  = 15.9 Hz, 7.8 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$  194.3, 167.2, 151.7, 136.0, 132.8, 131.3, 131.2, 130.4, 129.6, 128.1, 52.6; MS (ESI): 208 ( $M+NH_4$ ) $^+$ .

**Methyl 2-[(E)-2-(1,3-benzodioxol-2-yl)ethenyl]benzoate (6.11a).**


A suspension of methyl 2-[(E)-3-oxopropenyl]benzoate (**6.11b**) (190 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq), catechol (111 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq), magnesium sulfate (240 mg, 2.0 mmol, 2.0 eq) and *p*-toluenesulfonic acid (6 mg, 3 mol%) in benzene (10 ml) was refluxed with Dean Stark trap for 2 d. The reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ ethyl acetate 19:1) to give 97 mg (0.34 mmol/ 34%) of the analytically pure compound.  $C_{17}H_{14}O_4$ ; MW: 282;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.94 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.4 Hz, 0.4 Hz, 1H), 7.78 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H), 7.60 (dd,  $J$  = 7.9 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.50 (ddt,  $J$  = 7.3 Hz, 1.4 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.38 (dt,  $J$  = 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1H), 6.84-6.79 (m, 4H), 6.63 (dd,  $J$  = 6.6 Hz, 0.7 Hz, 1H),

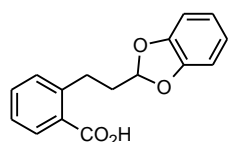
6.24 (dd,  $J = 15.9$  Hz, 6.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  167.5, 147.6, 137.3, 135.8, 132.5, 130.8, 129.1, 128.6, 128.0, 125.4, 121.7, 110.4, 108.7, 52.4; **MS** (ESI): 300 ( $\text{M}+\text{NH}_4$ ) $^+$ .

### 2-[(*E*)-2-(1,3-Benzodioxol-2-yl)ethenyl]benzoic acid (6.11).



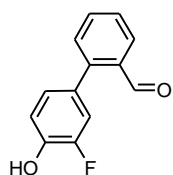
A solution of methyl 2-[(*E*)-2-(1,3-benzodioxol-2-yl)ethenyl]benzoate (6.11a) (95 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq) and lithium hydroxide (1.0 M, 1.7 ml, 1.7 mmol, 5.0 eq) in methanol (3.4 ml) was stirred at room temperature overnight. Amberlyst 15 was added to adjust the pH to 5-6. The mixture was filtered and washed with methanol. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ ethyl acetate 2:1  $\rightarrow$  1:1) to give 89 mg (0.33 mmol/ 99%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ; MW 268; **mp**: 143-144  $^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz):  $\delta$  8.13 (dd,  $J = 7.9$  Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.89 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 7.66-7.63 (m, 1H), 7.58 (ddt,  $J = 7.3$  Hz, 1.4 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.44 (dt,  $J = 7.5$  Hz, 1.3 Hz, 1H), 6.87-6.82 (m, 4H), 6.68 (dd,  $J = 6.7$  Hz, 0.7 Hz, 1H), 6.28 (dd,  $J = 15.8$  Hz, 6.7 Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  172.4, 147.6, 138.2, 135.9, 133.5, 131.8, 128.7, 128.4, 127.7, 125.8, 121.7, 110.4, 108.8; **IR**: 1677, 1479, 1228, 921, 727, 718  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 286 ( $\text{M}+\text{NH}_4$ ) $^+$ , **HPLC** analysis: retention time = 18.87 min; peak area, 99.8%, HPLC-method B.

### 2-[2-(1,3-benzodioxol-2-yl)ethyl]benzoic acid (6.12).



A suspension of 2-[(*E*)-2-(1,3-benzodioxol-2-yl)ethenyl]benzoic acid (6.11) (28 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq) and Pd/C (10 wt. % , 6 mg, 5 mol%) in ethyl acetate (2.0 ml) was stirred at room temperature for 2 h under a hydrogen atmosphere (1 atm.). The reaction mixture was filtered through celite and the crude product was purified by column chromatography (neat ethyl acetate) to give 28 mg (0.1 mmol/ 98%) of the analytically pure compound.  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FO}_4$ ; MW 270; **mp**: 126-127  $^\circ\text{C}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  11.32 (bs, 1H), 7.98 (dd,  $J = 7.8$  Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.51 (dt,  $J = 7.5$  Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.40 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.35 (dd,  $J = 10.7$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 6.85-6.77 (m, 4H), 6.20 (t,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 3.26-3.18 (m, 2H), 2.31-2.23 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  168.7, 148.6, 143.8, 133.1, 132.0, 131.9, 130.6, 127.2, 122.2, 112.1, 109.1, 36.9, 28.8; **IR**: 2922, 2853, 1687, 1484, 1236, 750  $\text{cm}^{-1}$ ; **MS** (ESI): 269 ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^-$ ; **HPLC** analysis: retention time = 13.90 min; peak area, 98.6%, HPLC-method A.

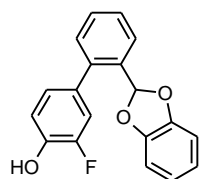
### 3'-Fluoro-4'-hydroxybiphenyl-2-carbaldehyde (6.15a).



According to **method 6.1** the title compound was prepared by reaction of 4-bromo-2-fluorophenol (6.14g) (191 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) with 2-formylphenylboronic acid (6.15b) (180 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq) in DME/water (12.0 ml). The crude product was

purified by column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 9:1) to give 163 mg (0.75 mmol, 75%) of the analytically pure compound. C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>FO<sub>2</sub>; MW 216; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  9.99 (s, 1H), 8.02 (ddd,  $J$  = 7.8 Hz, 1.4 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.66-7.61 (m, 1H), 7.52-7.47 (m, 1H), 7.41 (ddd,  $J$  = 7.7 Hz, 1.3 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.16-7.08 (m, 2H), 7.04 (ddd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.0 Hz, 0.9 Hz, 1H), 5.73 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  192.7, 150.9 (d,  $J$  = 239.6 Hz), 144.6 (d,  $J$  = 2.0 Hz), 144.0 (d,  $J$  = 14.2 Hz), 133.9, 133.8, 130.9, 130.7 (d,  $J$  = 6.2 Hz), 128.0, 128.0, 127.0 (d,  $J$  = 3.5 Hz), 117.5 (d,  $J$  = 2.6 Hz), 117.3 (d,  $J$  = 18.8 Hz); MS (ESI): 234 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>.

### 2'-(1,3-Benzodioxol-2-yl)-3-fluorobiphenyl-4-ol (6.15).



A suspension of methyl 3'-fluoro-4'-hydroxybiphenyl-2-carbaldehyde (6.15a) (262 mg, 1.21 mmol, 1.0 eq), catechol (147 mg, 1.33 mmol, 1.1 eq), magnesium sulfate (290 mg, 2.42 mmol, 2.0 eq) and *p*-toluenesulfonic acid (11 mg, 5 mol%) in benzene (6.0 ml) was refluxed with Dean Stark trap for 2 d. The reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane/ ethyl acetate 19:1) to give 48 mg (0.16 mmol/ 13%) of the analytically pure compound. C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>3</sub>; MW 308; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8.91 (s, 1H), 7.73 (dd,  $J$  = 7.7 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.55 (dt,  $J$  = 7.5 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.52-7.46 (m, 1H), 7.41 (dd,  $J$  = 7.6 Hz, 1.5 Hz, 0.5 Hz, 1H), 7.27-7.22 (m, 1H), 7.14 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.12-7.07 (m, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.90-6.85 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  151.9 (d,  $J$  = 241.1 Hz), 148.5, 145.5 (d,  $J$  = 13.0 Hz), 141.7 (d,  $J$  = 1.7 Hz), 134.2, 131.9 (d,  $J$  = 6.4 Hz), 131.2, 131.0, 128.7, 127.3, 126.8 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 122.6, 118.5 (d,  $J$  = 3.4 Hz), 118.0 (d,  $J$  = 19.0 Hz), 109.2, 108.5; IR: 1479, 1228, 1018, 734 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): 307 (M-H)<sup>-</sup>; HPLC analysis: retention time = 21.37 min; peak area, 99.4%, HPLC-method B.

## 6.8.2 Biological methods

### Inhibition of 17 $\beta$ -HSD14

Inhibitory activities were evaluated with a fluorimetric assay as previously described in chapter 3 (Kapitel 3).

## 6.9 Referenzen

- (1) Schiebel, J.; Radeva, N.; Krimmer, S. G.; Wang, X.; Stieler, M.; Ehrmann, F. R.; Fu, K.; Metz, A.; Huschmann, F. U.; Weiss, M. S.; Mueller, U.; Heine, A.; Klebe, G. Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 1693–1701.
- (2) Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2016.
- (3) Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.
- (4) Braun, F.; Bertolotti, N.; Möller, G.; Adamski, J.; Steinmetzer, T.; Salah, M.; Abdelsamie, A. S.; van Koppen, C. J.; Heine, A.; Klebe, G.; Marchais-Oberwinkler, S. First Structure–Activity Relationship of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 14 Nonsteroidal Inhibitors and Crystal Structures in Complex with the Enzyme. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10719–10737.
- (5) Heck, R. F.; Nolley, J. P. Palladium-Catalyzed Vinylic Hydrogen Substitution Reactions with Aryl, Benzyl, and Styryl Halides. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320–2322.
- (6) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. A Convenient Synthesis of Acetylenes: Catalytic Substitutions of Acetylenic Hydrogen with Bromoalkenes, Iodoarenes and Bromopyridines. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467–4470.
- (7) Lindlar, H. Ein Neuer Katalysator Für Selektive Hydrierungen. *Helv. Chim. Acta* **1952**, *35*, 446–450.
- (8) Kim, I. S.; Dong, G. R.; Jung, Y. H. Palladium(II)-Catalyzed Isomerization of Olefins with Tributyltin Hydride. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5424–5426.
- (9) Copeland, R. A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed.; Wiley-VCH: New York, 2000.
- (10) Morrison, J. F. The Slow-Binding and Slow, Tight-Binding Inhibition of Enzyme-Catalysed Reactions. *Trends Biochem. Sci.* **1982**, *7*, 102–105.
- (11) Morrison, J. F. Kinetics of the Reversible Inhibition of Enzyme-Catalysed Reactions by Tight-Binding Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *185*, 269–286.
- (12) Tomsho, J. W.; Pal, A.; Hall, D. G.; Benkovic, S. J. Ring Structure and Aromatic Substituent Effects on the PKa of the Benzoxaborole Pharmacophore. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 48–52.

# Zusammenfassung und Ausblick



In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Familie der  $17\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen ( $17\beta$ -HSDs) vorgestellt, die *in vitro* die Oxidation und/oder Reduktion von Steroidhormonen in Position 17 des Steroidgerüsts katalysieren.  $17\beta$ -HSDs besitzen die Fähigkeit lokale Konzentrationen von aktiven und inaktiven Hormonderivaten in bestimmten Gewebearten nach dem intrakrinen Konzept regulieren zu können.<sup>1</sup> Demnach können sie als molekulare Schalter betrachtet werden, die als Präzeptorregulatoren auf die Funktion von Steroidhormonen wirken, bevor sie an die entsprechenden Rezeptoren angreifen.<sup>2,3</sup> Die Blockade dieser Enzyme durch potente und selektive Inhibitoren kann daher ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung von steroidhormonabhängigen Erkrankungen sein. So konnten Inhibitoren für die  $17\beta$ -HSDs 1, 2 und 3 entwickelt werden, mit denen nach der *in vivo* Verabreichung ein „*proof of concept*“ für die Behandlung von Brustkrebs, Osteoporose und Prostatakrebs erbracht wurde.<sup>4-10</sup> Vor allem für die Subtypen 4-14 wurde weiterhin eine weitaus ausgeprägtere Multifunktionalität beschrieben, sodass diese ebenfalls andere Substrate als Steroidhormone zulassen.<sup>11-13</sup>

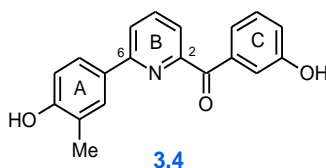
$17\beta$ -HSD14 ist das zuletzt identifizierte Mitglied dieser Enzymfamilie, das überwiegend im Gehirn, Leber, Plazenta und den Nieren exprimiert wird.<sup>14,15</sup> Durch die oxidative Deaktivierung von E2 durch das Enzym wurde ihm eine steroidogene Funktion zugeschrieben, für das JANSSON *et al.* erste Argumente erbrachten.<sup>16</sup> Der langsame katalytische Umsatz ( $k_{\text{cat}}$ -Wert) von E2 lässt diese Annahme jedoch fraglich erscheinen.<sup>15</sup>

Da die physiologische Rolle des Enzyms nicht vollständig aufgeklärt und die Frage nach dem natürlichen Substrat nicht zweifelsfrei beantwortet ist, war es das Ziel dieser Arbeit potente und selektive Inhibitoren der  $17\beta$ -HSD14 zu entwickeln. Diese sollten eine ergänzende strukturelle Charakterisierung des Enzyms ermöglichen und ferner zu *tool compounds* weiterentwickelt werden, um die physiologische Rolle des Enzyms untersuchen zu können.

LUKACIK *et al.* konnten eine Kristallstruktur von  $17\beta$ -HSD14 als Apoenzym erhalten, die jedoch eine relativ weit geöffnete Substratbindetasche aufweist. Durch die fehlende Sicherheit, dass es sich dabei um die aktive Konformation des Enzyms handelt, war an dieser Stelle eine strukturbasierte Entwicklung von Inhibitoren nicht möglich. Stattdessen sollten in einem ligandenbasierten Ansatz von

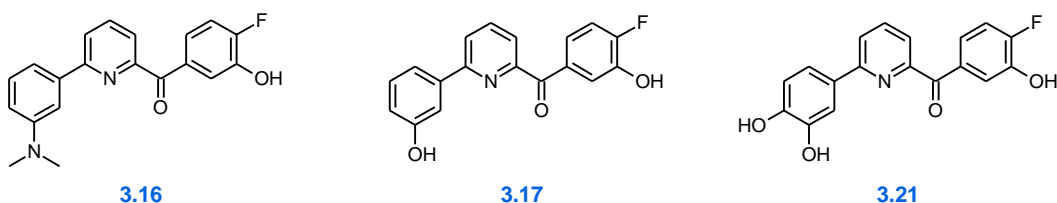


der AG R.W. HARTMANN (Universität des Saarlandes) entwickelte Inhibitoren der Subtypen 1 und 2 als mögliche Leitstrukturen dienen und optimiert werden. Hierbei konnte Verbindung **3.4** aus der 2,6-substituierten Pyridinklasse als vielversprechender Kandidat identifiziert werden (**Abb. 7.1**).



**Abb. 7.1:** Als Leitstruktur identifizierte Verbindung **3.4**.

Ausgehend von diesem Inhibitor wurden ca. 30 Verbindungen synthetisiert, von denen sechs als hochaktive Verbindungen ( $K_i < 15$  nM) zu identifizieren sind. Außerdem kann für Vertreter dieser Hemmstoffe ein günstiges Selektivitätsprofil gegenüber den nahe verwandten Subtypen 17 $\beta$ -HSD1 und 2 bestimmt werden. Ebenfalls sind diesen Inhibitoren gute physikochemische Eigenschaften zuzuordnen, die mit einer vielversprechenden Bioverfügbarkeit in Verbindung gebracht werden kann. Durch eine enge Zusammenarbeit mit NICOLE BERTOLETTI (AG KLEBE, Philipps-Universität Marburg) konnten Kristallstrukturen von 17 $\beta$ -HSD14 in Komplexen mit fünf der dargestellten Inhibitoren erhalten werden. Diese Strukturen ermöglichten zusammen mit den erhaltenen biologischen Ergebnissen die Aufstellung einer ersten systematischen Struktur-Wirkungsbeziehung für das Target. Aus dieser wird offensichtlich, dass eine azide Hydroxygruppe in 3-Position des C-Rings essentiell für eine gute Bindung zu 17 $\beta$ -HSD14 ist. Die Azidität dieser Funktion wird durch ein in Position 4 benachbartes F-Atom erhöht. Diese Hydroxygruppe steht über starke H-Brückenbindungen mit Tyr154 und Ser141 der katalytischen Triade in Kontakt, wobei diese Interaktionen durch die Ausbildung eines weitreichenden Wassernetzwerks stabilisiert werden. Für den A-Ring kann beobachtet werden, dass eine Hydroxygruppe in 3- und/oder 4-Position die inhibitorische Aktivität erhöhen (z.B. **3.17**:  $K_i = 7$  nM; **3.21**:  $K_i = 7$  nM), indem sie mit Ala149 interagieren. Die Einführung einer *N*-Methylgruppe an diesem Baustein bewirkt ebenfalls eine gute inhibitorische Wirkung gegenüber dem Target (**3.16**:  $K_i = 7$  nM, **Abb. 7.2**), die vermutlich aus weiteren hydrophoben Interaktionen der zusätzlichen Methylgruppen resultiert.

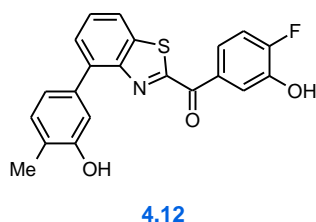


**Abb. 7.2:** Ausgewählte Verbindungen aus der Klasse der 2,6-substituierten Pyridinen.



Eine Erklärung dieser guten Bindung zu 17 $\beta$ -HSD14 wurde versucht anhand von modellierten Strukturen zu erhalten. Wie auch für andere Verbindungen, sollte in Zukunft versucht werden Kristallstrukturen der Liganden im Komplex mit dem Enzym zu erhalten. Auf diese Weise könnten zusätzliche Erkenntnisse der Struktur-Wirkungsbeziehung gewonnen werden.

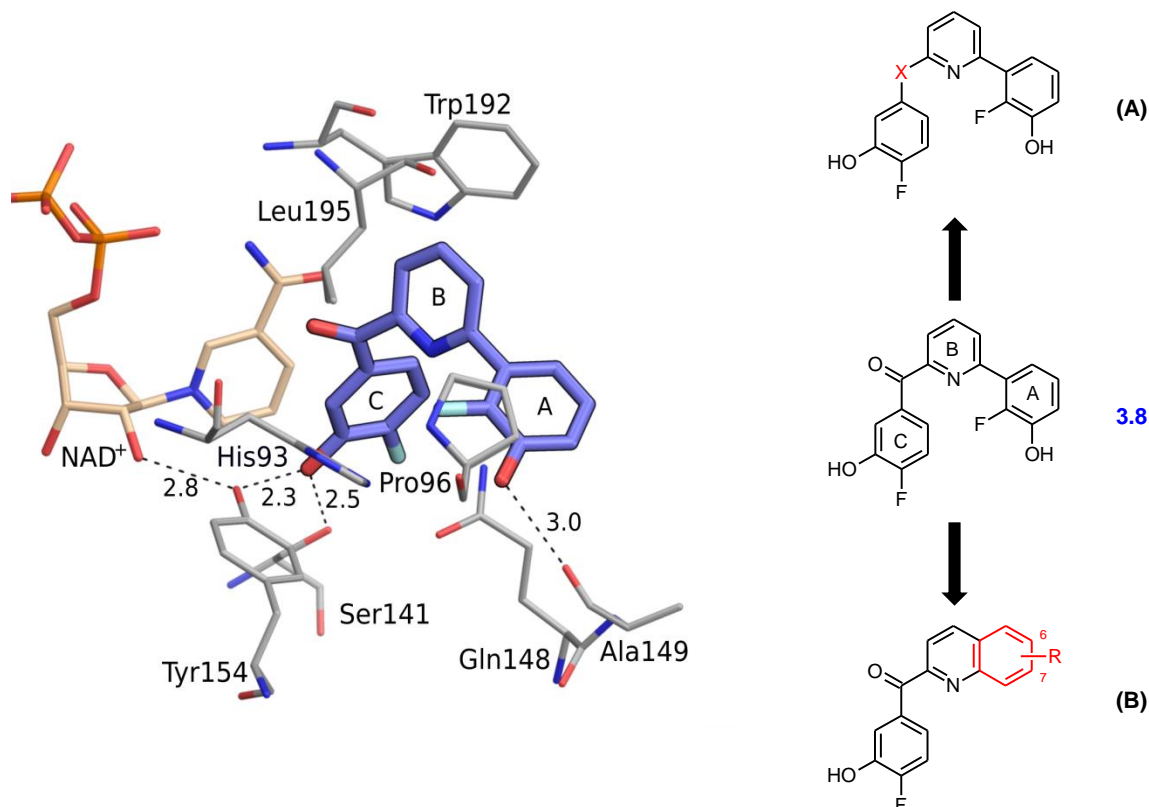
Neben den 2,6-substituierten Pyridinen wurden auch Verbindungen mit einem Benzothiazolketon- bzw. einem Benzothiazolamid-Grundgerüst als Leitstrukturen zur Entwicklung von potentiellen 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren identifiziert. Aus der ersten Klasse ging die hochpotente Verbindung **4.12** ( $K_i$  = 17 nM) hervor (**Abb. 7.3**). Durch das rationale Design von diesem Inhibitor war es möglich im Vergleich zur Ausgangsverbindung **4.3** die Affinität gegenüber dem Target, sowie die Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD1 zu erhöhen. Hier ist zeitnah die mögliche Bindung an die ERs zu ermitteln. Ebenso muss die Selektivität gegenüber dem HSD Subtypen 2 weiter untersucht werden. Alternativ könnte der Einsatz dieser Verbindungen als dualer 17 $\beta$ -HSD2/17 $\beta$ -HSD14 Inhibitor in Betracht gezogen werden, da beide Enzyme in der Lage sind die gleiche Reaktion zu katalysieren. Ferner sollte eine Kristallstruktur des Liganden **4.12** im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14 erhalten werden, um ein strukturbasiertes Inhibitor-design zu ermöglichen.



**Abb. 7.3:** Entworfenene Verbindung **4.12** aus der Klasse der Benzothiazolketone.

Die Benzothiazolamide stellten sich als interessant heraus, da für Vertreter dieser Klasse, neben der hohen Affinität zum Target, vor allem eine gute Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD2 zu beobachten ist. Für die alkylierten Amidderivate sind jedoch Probleme festzustellen, die eine Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten erschwert. Diese zeichneten sich zum einen durch eine schlechte Löslichkeit aus, die durch die Einführung polarer Substituenten erhöht werden könnte. Zum zweiten ist eine inherente Eigenfluoreszenz dieser Verbindung auszumachen, was zu einer Verfälschung der Assayergebnisse führen könnte. Die Verwendung eines alternativen Assays, der nicht auf einem fluoreszenzbasierten Prinzip basiert, könnte hier Abhilfe leisten. Ebenso wäre es möglich zum Benzothiazol bioisostere Bausteine zu untersuchen, die keine Eigenfluoreszenz und zusätzlich unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften besitzen.

Die in der 2,6-Pyridinketonklasse erhaltenen Komplex-Kristallstrukturen dienen im weiteren Verlauf des Projekts als Basis für ein strukturbasiertes Design von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren. Die hochpotente Verbindung **3.8** weist ein gutes Selektivitätsprofil gegenüber HSD1 und HSD2 auf und wurde stellvertretend für diese Studie gewählt (**Abb. 7.4**).

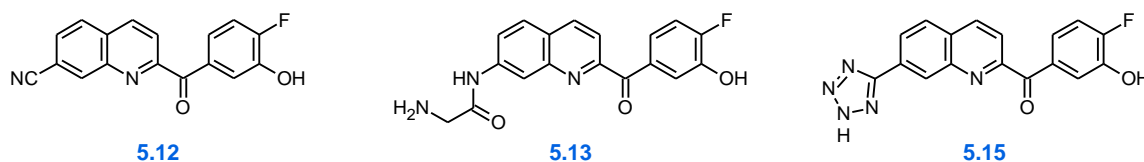


**Abb. 7.4:** (links) Kristallstruktur von 17 $\beta$ -HSD14 im Komplex mit Cofaktor NAD<sup>+</sup>, und **3.8**. Der Inhibitor ist als Stäbchenmodell mit den Kohlenstoffatomen in blau-violett dargestellt. Die Aminosäuren in einer Reichweite von 5 Å und der Cofaktor NAD<sup>+</sup> sind mit schmalen Bindungen visualisiert. H-Brücken sind als gestrichelte Linien mit ihren Längen in Å veranschaulicht; (rechts) Durchgeführte Modifikationen ausgehend vom Pyridinketon **3.8**.

Da keine spezifischen Interaktionen der Carbonylgruppe des Inhibitors mit dem Protein beobachtet werden kann, wurde diese durch verschiedene *linker* zwischen dem B- und dem C-Ring ersetzt. Der Austausch der Carbonylgruppe liefert jedoch zur Startverbindung **3.8** vorwiegend äquipotente Inhibitoren. Hervorzuheben ist das Ethenylderivat **5.4**, für das in diesem Ansatz eine zehnfache Steigerung der Affinität zu 17 $\beta$ -HSD14 bestimmt werden kann (**3.8**:  $K_i = 13$  nM vs. **5.4**:  $K_i = 1.5$  nM). Wie auch für die übrigen potenten Inhibitoren dieses Ansatzes, ist eine gute Selektivität gegenüber 17 $\beta$ -HSD10 zu bestimmen, welches eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum Target zeigt. Allerdings weisen diese Substanzen eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber den Subtypen 1 und 2 auf. Somit kann festgestellt werden, dass die Carbonylgruppe der Verbindung **3.8** eine Selektivität zu diesen Subtypen induziert. In Zukunft sollten diese Beobachtungen weiter untersucht werden. Durch Dockingstudien an 17 $\beta$ -HSD1 könnte beispielsweise eine mögliche Erklärung für die höhere Affinität

zu diesem Enzym gefunden werden. Die gute Selektivität zu HSD10 kann anhand der flachen aktiven Tasche dieses Enzyms erklärt werden, in welche die dargestellten „V-förmigen“ Liganden nicht binden können. Im weiteren Verlauf des Projekts könnten zusätzliche Motive als Verbindungsglieder zwischen dem B- und dem C-Ring untersucht werden, um die Selektivität, die pharmakokinetischen Eigenschaften und um die metabolische Stabilität der Inhibitoren weiter auszuloten.

Nach den bis dahin gewonnenen Erkenntnissen wurde die Carbonylgruppe im nächsten Ansatz beibehalten, bei dem der Pyridinbaustein zu einer Chinolinstruktur erweitert wurde. Dadurch sollte eine hydrophobe Region in der Nähe von Trp192 in der aktiven Tasche des Targets besser adressiert werden (**Abb. 7.4**). Aus der Entwicklung dieser chinolinbasierenden Inhibitoren gingen hochpotente 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren hervor. Neben der pyridinbasierenden Ausgangsverbindung **3.8** weisen drei weitere Substanzen (**5.12**, **5.13** und **5.15**, **Abb. 7.5**) ein gutes Selektivitätsprofil gegenüber den 17 $\beta$ -HSD Subtypen 1, 2 und 10 auf.



**Abb. 7.5:** Interessanteste chinolinbasierende Inhibitoren **5.12**, **5.13** und **5.15**.

Ferner zeichnen sie sich durch eine sehr geringe Zytotoxizität aus und zeigen keinen Einfluss auf die Effluxpumpe P-gp. Für zwei dieser Verbindungen, **3.8** und **5.12**, konnten vielversprechende physikochemischen Eigenschaften berechnet werden, die eine mögliche Penetration der Blut-Hirn-Schranke vorhersagen. Dadurch könnten diese Inhibitoren als mögliche *tool compounds* für eine *in vivo* Applikation im zentralen Nervensystem dienen. In den folgenden Schritten sollten für diese Verbindungen weitere Untersuchungen bezüglich der AMDE-Parameter angestrebt werden und die metabolische Stabilität der Inhibitoren untersucht werden.

Zusätzlich konnte bei dieser Studie ein alternativer Bindungsmodus für Verbindung **5.10** in die aktive Tasche des Targets ausgemacht werden. Dieser wird lediglich durch die Einführung einer Methylgruppe hervorgerufen. Dennoch kann für diese Verbindung eine hohe Affinität zum Target bestimmt werden ( $K_i = 6$  nM). Dies erschien zunächst verwunderlich, da durch die alternative Pose des Inhibitors die 3-OH Gruppe am Phenylring nicht in der Lage ist, eine H-Brücke mit Tyr154 auszubilden. Diese wurde zuvor als essentiell für eine gute Bindung zu 17 $\beta$ -HSD14 beschrieben. Die nicht ausgebildete Interaktion muss somit gleichwertig ersetzt worden sein. Unter anderem kann ein Wassermolekül ausgemacht werden, dass einen Kontakt zwischen dem Liganden und dem Protein vermittelt. Da dieses Wassermolekül näher der katalytischen Triade zu finden ist und es in weiteren Kristallstrukturen beobachtet wird, könnte ihm eine potentielle Rolle im katalytischen Mechanismus

des Proteins zukommen. Zur Identifizierung von alternativen Leitstrukturen mit Hilfe von Dockingstudien sollte der alternative Bindungsmodus in jedem Fall weiter berücksichtigt werden.

Im letzten Kapitel dieser Arbeit wurde ein fragmentbasierter Ansatz verfolgt, um neue Leitstrukturen zur Entwicklung von 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren zu identifizieren. Aus einem *fragment-based lead discovery* gingen Salicylsäure **6.1** und das Benzodioxolderivat **6.2** als *screening hits* hervor. Der bei einer Inhibitorkonzentration von 250  $\mu$ M schwache Inhibitor **6.1** wurde in einem ersten Ansatz mit den aus **Kapitel 3** und **Kapitel 5** bekannten Phenylpyridin- und Chinolinbausteinen erweitert (*fragment-growing*). Daraus resultierten sechs äquipotente Verbindungen, die im Vergleich zum ursprünglichen Fragment eine deutliche Steigerung der inhibitorischen Aktivität aufweisen (**6.1**: 15% vs. z.B. **6.5**: 93% Inhibition bei 250  $\mu$ M,  $K_i = 1.9 \mu$ M). Von Verbindung **6.5** konnte eine Kristallstruktur im Komplex mit 17 $\beta$ -HSD14 beschrieben werden, die eine Interaktion der Carbonsäure mit Tyr154 und Ser141 erkennen lässt. So konnte ein Beweis für den gleichen Bindungsmodus des *screening hits* **6.1** und der daraus entworfenen Verbindung **6.5** erbracht werden. Somit ist ein *fragment-based lead discovery* eine Möglichkeit zur Entdeckung von alternativen Leitstrukturen bei der Suche nach 17 $\beta$ -HSD14 Inhibitoren.

## Referenzen

- (1) Labrie, F. Intracrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1991**, 78, C113-118.
- (2) Labrie, F.; Luu-The, V.; Lin, S. X.; Simard, J.; Labrie, C.; El-Alfy, M.; Pelletier, G.; Bélanger, A. Intracrinology: Role of the Family of 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases in Human Physiology and Disease. *J. Mol. Endocrinol.* **2000**, 25, 1–16.
- (3) Penning, T. M. Hydroxysteroid Dehydrogenases and Pre-Receptor Regulation of Steroid Hormone Action. *Hum. Reprod. Update* **2003**, 9, 193–205.
- (4) Lawrence, H. R.; Vicker, N.; Allan, G. M.; Smith, A.; Mahon, M. F.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. Novel and Potent 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2759–2762.
- (5) Messinger, J.; Hirvelä, L.; Husen, B.; Kangas, L.; Koskimies, P.; Pentikäinen, O.; Saarenketo, P.; Thole, H. New Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, 248, 192–198.
- (6) Husen, B.; Huhtinen, K.; Saloniemi, T.; Messinger, J.; Thole, H. H.; Poutanen, M. Human Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 1 Expression Enhances Estrogen Sensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cell Xenografts. *Endocrinology* **2006**, 147, 5333–5339.
- (7) Husen, B.; Huhtinen, K.; Poutanen, M.; Kangas, L.; Messinger, J.; Thole, H. Evaluation of Inhibitors for 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Vivo in Immunodeficient Mice Inoculated with MCF-7 Cells Stably Expressing the Recombinant Human Enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, 248, 109–113.
- (8) Ayan, D.; Maltais, R.; Roy, J.; Poirier, D. A New Nonestrogenic Steroidal Inhibitor of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I Blocks the Estrogen-Dependent Breast Cancer Tumor Growth Induced by Estrone. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, 11, 2096–2104.
- (9) Bagi, C. M.; Wood, J.; Wilkie, D.; Dixon, B. Effect of 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Inhibitor on Bone Strength in Ovariectomized Cynomolgus Monkeys. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2008**, 8, 267–280.
- (10) Day, J. M.; Foster, P. A.; Tutill, H. J.; Schmidlin, F.; Sharland, C. M.; Hargrave, J. D.; Vicker, N.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Purohit, A. STX2171, a 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3 Inhibitor, Is Efficacious in Vivo in a Novel Hormone-Dependent Prostate Cancer Model. *Endocr. Relat. Cancer* **2013**, 20, 53–64.
- (11) Mindnich, R.; Möller, G.; Adamski, J. The Role of 17 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2004**, 218, 7–20.
- (12) Moeller, G.; Adamski, J. Integrated View on 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, 301, 7–19.
- (13) Marchais-Oberwinkler, S.; Henn, C.; Möller, G.; Klein, T.; Negri, M.; Oster, A.; Spadaro, A.; Werth, R.; Wetzels, M.; Xu, K.; Frotscher, M.; Hartmann, R. W.; Adamski, J. 17 $\beta$ -

- Hydroxysteroid Dehydrogenases (17 $\beta$ -HSDs) as Therapeutic Targets: Protein Structures, Functions, and Recent Progress in Inhibitor Development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *125*, 66–82.
- (14) Haeseleer, F.; Palczewski, K. Short-Chain Dehydrogenases/Reductases in Retina. *Methods Enzymol.* **2000**, *316*, 372–383.
- (15) Lukacik, P.; Keller, B.; Bunkoczi, G.; Kavanagh, K.; Hwa Lee, W.; Adamski, J.; Oppermann, U. Structural and Biochemical Characterization of Human Orphan DHRS10 Reveals a Novel Cytosolic Enzyme with Steroid Dehydrogenase Activity. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 419–427.
- (16) Jansson, A. K.; Gunnarsson, C.; Cohen, M.; Sivik, T.; Stål, O. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase 14 Affects Estradiol Levels in Breast Cancer Cells and Is a Prognostic Marker in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11471–11477.







# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Klebe für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die interessante Aufgabenstellung. Ebenfalls bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und für die Freiheiten bei allen Forschungsvorhaben während meiner Promotion. Zudem möchte ich mich für die exzellente Arbeitsatmosphäre bedanken mit dem Aufenthalt in Hirschegg als Höhepunkt. Letztendlich bedanke ich mich für das Korrekturlesen meiner Dissertation und für das stets offene Ohr, auch bei außeruniversitären Angelegenheiten.

Dr. Sandrine Marchais-Oberwinkler für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Durchführung einer Vielzahl von Experimenten und für die Zahlreichen Diskussionen und Anregungen, ohne die das Projekt nicht so schnell zu den erzielten Ergebnissen geführt hätte.

Nicole Bertolotti für eine hervorragende Zusammenarbeit. Vielen Dank für das Protein, die Kristallstrukturen, das gemeinsame Verfassen der Manuskripte, aber vor allem für die vielen Abbildungen und die Einführung in PyMol und MOE.

Prof. Dr. Andreas Heine für die konstruktiven Diskussionen beim Verfassen der Manuskripte.

meinen Kollegen des Syntheselabors Khang Ngo und Ahmed „Achim“ Merabet für die produktiven Diskussionen bei Syntheseproblemen und für alle weiteren sinnvollen Aktionen (Palmen aus Plastik, Kreidekunstwerke, fliegende Schildkröte...). Aber vor allem bedanke ich mich für das Korrekturlesen meiner Dissertation und entschuldige mich für meinen geringen Wortschatz.

Jud für die sehr netten Gespräche.

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Klebe, Reuter, Kolb und Schlitzer für die freundliche Aufnahme, die exzellente Arbeitsatmosphäre und für die Hilfe bei diversen Fragen.

Lydia Hartleben für die bearbeiteten Chemikalienbestellungen und für die nette Unterstützung bei bürokratischen Angelegenheiten.

Hans-Dieter Gerber und Dr. Jonathan Cramer für die Aushilfe mit Chemikalien und das stets offene Ohr bei Synthesefragen.

meinen Vertiefern Laura Sinatra, Estelle Souquet, Lukas Zygalski, Erik Kerste, Greta Linden, Andreas Schmidt, Yvonne Grell, Matthias Tripp, Niklas Eizenhöfer und Arian Reincke für die Unterstützung während ihrer Praktika.

Prof. Dr. Torsten Steinmetzer für die Möglichkeit die HPLC-Anlagen des Arbeitskreises für analytische und präparative Experimente nutzen zu dürfen.

Prof. Dr. Roland Hartmann für die Möglichkeit das Tacan benutzen zu dürfen.

unseren Kollaborationspartnern aus Saarbrücken: Prof. Dr. R. W. Hartmann für die Überlassung der HSD-Strukturbibliothek, Mohamed Salah, Dr. Ahmed Abdelsamie, Dr. Martin Frotscher und Jannine Ludwig für die Durchführung der 17 $\beta$ -HSD1 und -2 Selektivitätsassays. Unseren Partnern aus München: Prof. Dr. Jerzy Adamski und Dr. Gabriele Möller für die Vermessung der ersten Strukturbibliothek und für die 17 $\beta$ -HSD10 Daten. Zudem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Marc Le Borgne, Prof. Dr. Pierre Falcon, Nathalie Guragossian und den weiteren Mitglieder der Arbeitsgruppen in Lyon für die interessante Zeit in Frankreich und für die erhaltenen Ergebnisse.

allen Assistenten des 5- und 8-Semester Praktikums.

den Mitarbeitern der Analytikabteilungen. Besonders Herrn Stefan Newel für die Durchführung von Sondermessungen, die auch mal länger dauerten.

Andreas Weisbecker und Jürgen Jung und Jörg Kutsch für die Servicearbeiten.

Karl-Heinz Makowiecki für die Einblicke in glastechnische Arbeiten und das Anfertigen von vielen Sonderwünschen fürs Labor.

letzten Endes vor allem meiner Familie und meinen Freunden für deren Unterstützung und für den ganzen Rest neben der Uni.

## **Lebenslauf**



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase 14 (17 $\beta$ -HSD14):  
Entwicklung und Synthese potenter und selektiver Inhibitoren  
zur strukturellen Charakterisierung und Untersuchung der  
physiologischen Rolle des Enzyms**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 25.08.2017.

.....  
Florian Braun

